



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมัน
ในกล้ามเนื้อปลาไขมันสูงระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น
**A role of myoglobin on lipid oxidation in fatty fish muscle
during chilled storage**

โดย มหัทธ ชัยจันทร์ และคณะ

สิงหาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมัน
ในกล้ามเนื้อปลาไขมันสูงระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น
**A role of myoglobin on lipid oxidation in fatty fish muscle
during chilled storage**

คณะผู้วิจัย

1. มหัทธ ชัยจันทร์
2. สุทธวัฒน์ เบญจกุล

สังกัด

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
Executive Summary	5
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	6
วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
ระเบียบวิธีวิจัย	15
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	40
กิตติกรรมประกาศ	40
เอกสารอ้างอิง	40
Output ที่ได้จากโครงการ	44
ภาคผนวก	45

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุก พบว่า กล้ามเนื้อปลาโอและกล้ามเนื้อปลาดุกมีคุณลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ที่แตกต่างกัน และองค์ประกอบเหล่านี้ในปลาชนิดเดียวกันจะมีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อปลาโอทั้งในส่วนเนื้อดำและเนื้อขาวมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุก ($p<0.05$) และในทางตรงกันข้าม กล้ามเนื้อปลาดุกโดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อขาวมีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาโอ ($p<0.05$) จากการแยกส่วนโปรตีนกล้ามเนื้อ พบว่า โปรตีนไมโอไฟบริลเป็นโปรตีนหลักที่พบในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด และปริมาณโปรตีนไมโอไฟบริลพบได้มากกว่าในกล้ามเนื้อปลาโอเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกทั้งในส่วนของกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาว ($p<0.05$) ไมโอซินเส้นหนัก และ แอ็กติน เป็นโปรตีนหลักที่พบในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด กล้ามเนื้อดำของปลาโอมีปริมาณโปรตีนซาร์โคพลาสมิกโดยเฉพาะอย่างยิ่งไมโอโกลบินสูงที่สุด ($p<0.05$) ปลาดุกทั้งในส่วน of กล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาวมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าปลาโอ กล้ามเนื้อขาวของปลาโอมีปริมาณฟอสโฟลิปิดสูงสุด กล้ามเนื้อปลาโอทั้งในส่วนกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาวมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุก ($p<0.05$) กล้ามเนื้อดำของปลาโอมีแร่ธาตุซึ่งได้แก่ เหล็ก ทองแดง และเซเลเนียมเป็นองค์ประกอบมากที่สุด ($p<0.05$) กล้ามเนื้อขาวของปลาทั้ง 2 ชนิด มีค่าพีเอชสูงกว่ากล้ามเนื้อดำ ($p<0.05$) ปลาโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วน of กล้ามเนื้อดำ สีแดงคล้ำสูงสุด โดยมีความสว่าง (L^*) และความเป็นสีเหลือง (b^*) ต่ำสุด ความเป็นสีแดง (a^*) และดัชนีสีแดง (a^*/b^*) สูงสุด ($p<0.05$) ไขมันจากกล้ามเนื้อดำของปลาทั้ง 2 ชนิด มีความว่องไวต่อการเกิดออกซิเดชันได้เร็วกว่ากล้ามเนื้อขาวเนื่องจากมีค่า induction time เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Rancimat ต่ำสุด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่น ในกล้ามเนื้อดำ (dark muscle) กล้ามเนื้อขาว (ordinary muscle) และกล้ามเนื้อรวม (whole muscle) ของปลาโอและปลาดุก ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 15 วัน พบว่าค่าพีเอชของกล้ามเนื้อปลาทั้งหมดเกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ส่วนค่า TVB พบว่ากล้ามเนื้อปลาทุกชนิดจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการเก็บรักษา การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมันอิสระเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในกล้ามเนื้อปลาโอทั้งในส่วนกล้ามเนื้อดำ กล้ามเนื้อขาวและกล้ามเนื้อรวม อัตราการเกิดและอัตราการสลายตัวของ conjugated diene มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อดำของปลาทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มให้ค่า peroxide value (PV) สูงสุดตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) TBARS พบว่ากล้ามเนื้อปลาโอทุกชนิดมีค่าสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุกตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่าไขมันในกล้ามเนื้อปลาโอมีความว่องไวและมีอัตราการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าไขมันในกล้ามเนื้อปลาดุก ปริมาณ heme iron มีแนวโน้มลดลงในกล้ามเนื้อปลาโอ และมีแนวโน้มคงที่ในกล้ามเนื้อปลาดุก ส่วนปริมาณ non-heme iron พบว่า กล้ามเนื้อปลาโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อ

ดามีค่าสูงกว่าตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา และพบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ non-heme iron เพียงเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษาในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด การเปลี่ยนแปลงปริมาณ oxymyoglobin และ metmyoglobin ของกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า oxymyoglobin เกิดการออกซิเดชันไปเป็น metmyoglobin และเกิดการออกซิเดชันต่อเนื่องไปเป็นอนุพันธ์อื่น ๆ กล้ามเนื้อปลาดุกมีแนวโน้มของดัชนีสีแดงเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงดัชนีสีแดงจะเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในกล้ามเนื้อปลาโอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อดำ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ protein carbonyl ในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด พบว่าอัตราการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนมีความผันแปรขึ้นอยู่กับนชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ

จากการศึกษาผลของ ferrous myoglobin ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันของปลาโอและปลาดุกในระบบจำลอง lecithin - liposome โดยการวิเคราะห์ค่า conjugated diene และ TBARS ในระหว่างการบ่มเป็นเวลา 180 นาที พบว่า ferrous myoglobin ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM จะมีผลในการเร่งการออกซิเดชันของไขมันสูงสุดทั้งในปลาดุกและปลาโอ อัตราการออกซิเดชันของไขมันในปลาที่เร่งด้วย ferrous myoglobin นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและอุณหภูมิ โดยที่ 25 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มของการเร่งออกซิเดชันสูงที่สุด และพีเอชมีอิทธิพลต่ออัตราการออกซิเดชันของไขมันในปลาที่เร่งด้วย ferrous myoglobin ในปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยถ้าพิจารณาเฉพาะค่า TBARS ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงมาจาก conjugated diene นั้นสามารถสรุปได้ว่าการออกซิเดชันของไขมันในปลาโอและปลาดุกมีค่าสูงสุดที่พีเอช 7 จากการศึกษาค้นคว้าของเกลือต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin พบว่า ค่า conjugated diene มีค่าสูงที่สุดในปลาดุกในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 2.5 ส่วนค่า TBARS นั้นพบว่า ปลาโอมีค่า TBARS สูงกว่าปลาดุกในทุก ๆ ระดับความเข้มข้นของเกลือ นอกจากนี้ยังพบว่า การออกซิเดชันของไขมันในระบบที่มี ferrous myoglobin จะถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นสูง ๆ เมื่อพิจารณาผลของ EDTA ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin พบว่าความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันของ EDTA ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ รวมทั้งชนิดของปลา

คำสำคัญ ไมโอโกลบิน ออกซิเดชัน ไขมัน กล้ามเนื้อ ปลาไขมันสูง การแช่เย็น

Abstract

Chemical compositions of catfish and Frigate mackerel muscles were characterized. Characteristics, chemical and physical compositions were different among species as well as muscle types. Frigate mackerel muscle contained a greater content of protein compared with catfish muscle ($p < 0.05$). Catfish, particularly ordinary muscle composed of a higher lipid content than Frigate mackerel muscle ($p < 0.05$). From muscle protein fractionation, myofibrillar proteins were major proteins found in both muscles. Frigate mackerel muscle, both dark and ordinary muscles, contained greater contents of myofibrillar proteins than catfish muscle ($p < 0.05$). Myosin heavy chain and actin were predominant proteins found in myofibrillar protein fraction in both fish. Dark muscle from Frigate mackerel composed of the highest sarcoplasmic proteins, especially myoglobin ($p < 0.05$). The highest carotenoid content was noticeable in both dark and ordinary muscles from catfish muscle. Ordinary muscle from Frigate mackerel had the highest phospholipid content. Both dark and ordinary muscles from Frigate mackerel contained a greater content of sodium chloride compared with those from catfish ($p < 0.05$). The highest contents of iron, copper and selenium were found in Frigate mackerel dark muscle ($p < 0.05$). The pH of ordinary muscle from both species was higher than dark muscle ($p < 0.05$). Frigate mackerel, especially dark muscle, exhibited the most dark-red color as shown by the lowest L^* and b^* values with the highest a^* value and redness index (a^*/b^*) ($p < 0.05$). Lipid from dark muscle of both species was more susceptible to oxidation than that from ordinary muscle as indicated by the lowest induction time analysed by Rancimat test.

Changes in lipid, myoglobin, color and odor in dark, ordinary and whole muscles from catfish and Frigate mackerel during refrigerated storage (4°C) for 15 days were investigated. A negligible change in pH was found in both species during storage. Total volatile base (TVB) contents of all muscles tended to increase with increasing storage time. Changes in free fatty acid content occurred with the highest degree in all muscles from Frigate mackerel. Formation and decomposition rates of conjugated diene were different among fish species and muscle types. Dark muscle of both species tended to have the highest peroxide value (PV) throughout the storage period. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values of all types of Frigate mackerel muscles were higher than those of catfish muscles till the end of storage period indicating a higher degree of lipid oxidation in Frigate mackerel muscle. For the changes in heme iron content, a decrease was found in Frigate mackerel and no marked

change was found in catfish muscle. Frigate mackerel, especially dark muscle, showed a higher content of non-heme iron throughout the storage time and a slight change in non-heme iron content was found in both species during storage. The changes in oxymyoglobin and metmyoglobin contents of muscles from both species tended to follow the same trend. Both myoglobin derivatives tended to decrease during storage indicating the oxidation of oxymyoglobin to form metmyoglobin and other derivatives. A slight change in redness index was found in catfish muscle but a marked change was observed in Frigate mackerel, especially dark muscle. For the protein carbonyl content, it was noted that the rate of protein oxidation in fish muscle depended on fish species and muscle type.

The prooxidative activities of ferrous myoglobin on catfish and Frigate mackerel lipid oxidations in lecithin-liposome model systems were investigated by monitoring the changes in conjugated diene and TBARS during incubation for 180 min. The results showed that ferrous myoglobin at a concentration of 0.1 mM exhibited the highest prooxidative activity towards catfish and Frigate mackerel lipids. It was also found that the prooxidative activity of ferrous myoglobin was species and temperature dependent. The highest degree of lipid oxidation was found at 25°C. The pH influenced the lipid oxidation induced by ferrous myoglobin with varying degrees depending on fish species. Considering the TBARS value, a secondary lipid oxidation product derived from conjugated diene, it was stated that lipid oxidation in catfish and Frigate mackerel was found to be the highest at pH 7. For the effect of sodium chloride on the lipid oxidation catalyzed by ferrous myoglobin, the highest conjugated diene was found in catfish the presence of 2.5 % and the TBARS value of Frigate mackerel was higher than catfish at all sodium chloride concentration. In addition, the prooxidative activity of ferrous myoglobin was enhanced by the addition of hydrogen peroxide especially at high concentration. For the inhibitory activity of EDTA towards lipid oxidation in the presence of ferrous myoglobin, it was suggested that the ability to inhibit the lipid oxidation of EDTA was governed by EDTA concentration and fish species.

Keywords: myoglobin, oxidation, lipid, muscle, fatty fish, chilled storage

Executive Summary

งานวิจัยชิ้นนี้มีเป้าหมายในการศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาที่มีไขมันสูง โดยเลือกใช้ปลาโอและปลาดุกเป็นตัวแทนของปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่มีไขมันสูง ตามลำดับ ซึ่งเบื้องต้นได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาเหล่านั้น ทั้งในส่วนของกล้ามเนื้อดำ และกล้ามเนื้อขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการอธิบายผลการทดลองในขั้นต่อไป ขั้นที่ 2 ได้ทำการพิสูจน์ให้เห็นว่าการออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุกเกิดขึ้นจริงในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่นในกล้ามเนื้อปลาเหล่านี้ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 วัน และในขั้นที่ 3 ได้ศึกษาปัจจัยสำคัญบางประการที่มีผลในการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วยไมโอโกลบิน โดยศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันของปลาโอและปลาดุกในระบบจำลอง lecithin - liposome

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สามารถสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่มีไขมันสูง ซึ่งได้แก่ ปลาโอ และปลาดุก รวมทั้งสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่นของกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด ในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น โดยได้นำเสนอเทคนิคต่าง ๆ เพื่อให้เกิดความหลากหลายในการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงเหล่านั้น และได้ทราบกลไกในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของไมโอโกลบินในการกระตุ้นการออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาทั้งสองชนิด

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื้อปลาเป็นวัสดุทางชีวภาพที่ประกอบด้วยความชื้น และสารอาหารต่าง ๆ ค่อนข้างสูง เนื้อปลาจึงเป็นวัตถุดิบที่ง่ายต่อการเสื่อมเสียทั้งที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์และปฏิกิริยาเคมี การเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมี เคมี และจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลาที่อุณหภูมิต่ำ เป็นสาเหตุให้กล้ามเนื้อเกิดการเสื่อมเสีย รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ (Pacheco-Aguilar และคณะ, 2000; O'Grady และคณะ, 2001; Faustman และคณะ, 1992) การเปลี่ยนแปลงของไขมันเกิดขึ้นได้ง่ายในระหว่างการเก็บเกี่ยว และเก็บรักษาปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง (Cho และคณะ, 1989; McDonald และ Hultin, 1987) ปฏิกิริยาสำคัญที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การไฮโดรไลซิสและออกซิเดชันของไขมัน (Pacheco-Aguilar และคณะ, 2000) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขมันถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสและ/หรือ ฟอสโฟไลเปส ทำให้เกิดการกรดไขมันอิสระซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างต่อเนื่อง เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิ จำพวกแอลดีไฮด์ คีโตน และแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส รสชาติ สี และเนื้อสัมผัสของปลาและผลิตภัณฑ์ได้ (Toyomizu และคณะ, 1981)

ไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อปลาสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายกว่าสัตว์เลื้อยคลาน ด้วยนมและสัตว์ปีก เนื่องจากการกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Foegeding และคณะ, 1996) กลไกพื้นฐานของการออกซิเดชันของไขมันประกอบด้วย 3 ขั้นตอนสำคัญ ได้แก่ ขั้นตอนเริ่มต้นปฏิกิริยา (initiation) ขั้นตอนเหนี่ยวนำ (propagation) และขั้นตอนหยุดปฏิกิริยา (termination) (Undeland, 2001; Nawar, 1996) กลไกการออกซิเดชันของไขมันดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ตัวอย่างเช่น ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โลหะ ไมโอโกลบิน เอนไซม์ ฟีเอช อุณหภูมิ ความแรงออกซิเจน และออกซิเจน เป็นต้น (Andreo และคณะ, 2003; Undeland, 2001; Harris และ Tall, 1994; Renner และ Labas, 1978) โลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแบบไม่อาศัยเอนไซม์ที่สำคัญ ซึ่งเหล็กที่พบในกล้ามเนื้อส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปโปรตีนฮีม เช่น ไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบินและไซโทโครม จึงเรียกเหล็กเหล่านี้ว่า heme iron ซึ่งเป็นเหล็กที่ไม่ว่องไวต่อการออกซิเดชัน แต่ถ้าเหล็กเหล่านี้หลุดออกมาเป็นอิสระจะเรียกเหล็กประเภทนี้ว่า nonheme iron ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน การเกิดเหล็กอิสระสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยกระบวนการแปรรูป เช่น การให้ความร้อน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้เหล็กอิสระยังมีอยู่ในเนื้อหรือสามารถเกิดได้จากการแปรรูปอีกด้วย เช่น การบดเนื้อด้วยเครื่องบดที่ทำด้วยเหล็กจะมีโอกาสทำให้เหล็กปนเปื้อนลงไปในเนื้อบดได้ จึงมีผลส่งเสริมการออกซิเดชันของไขมันได้ มีรายงานว่าไมโอโกลบินและโปรตีนฮีมอื่นๆ ในกล้ามเนื้อสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อได้

(Love, 1983) Chaijan และคณะ (2005) รายงานว่าการออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาชาร์ดินและปลาแมกเคอเรลเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาในน้ำแข็งเพิ่มขึ้น เนื่องจากการปลดปล่อยเหล็กออกมาจากฮีโมโกลบินมากขึ้น Haard (1992) รายงานว่า การเกิดสีซีดจางของเนื้อปลาทูน่าในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งมีสาเหตุเนื่องมาจากเกิดการออกซิเดชันของไมโอโกลบิน (Haard, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเกิดเมทไมโอโกลบินสามารถเหนี่ยวนำให้ไขมันเกิดการออกซิเดชันได้ (Lee และคณะ, 2003; Chan และคณะ, 1997) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีเป้าหมายในการศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาที่มีไขมันสูง โดยเลือกใช้ปลาโอและปลาดุกเป็นตัวแทนของปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่มีไขมันสูง ตามลำดับ ซึ่งเบื้องต้นจะทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาเหล่านั้น ทั้งในส่วนของกล้ามเนื้อดำ และกล้ามเนื้อขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการอธิบายผลการทดลองในขั้นต่อไป ขั้นที่ 2 จะทำการพิสูจน์ให้เห็นว่าการออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุกเกิดขึ้นจริงในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยจะเปรียบเทียบอัตราการเกิดออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อดำ กล้ามเนื้อขาว และกล้ามเนื้อรวม ของปลาทั้ง 2 ชนิด ซึ่งกล้ามเนื้อเหล่านี้อาจมีปริมาณไมโอโกลบินที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน ทำให้ทราบเบื้องต้นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไมโอโกลบินที่ส่งผลทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน จากนั้นในขั้นตอนสุดท้ายจะทำการศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระบบจำลองของ lecithin - liposome โดยจะทำการศึกษาผลของ ferrous myoglobin (Fe^{2+}) ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (เป็นผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไมโอโกลบิน) ผลของเกลือ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ พีเอช และสารต้านออกซิเดชันบางประเภท เช่น EDTA ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระบบจำลองดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุก
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่นในกล้ามเนื้อโอและปลาดุกระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น
3. ศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันของปลาโอและปลาดุกในระบบจำลอง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

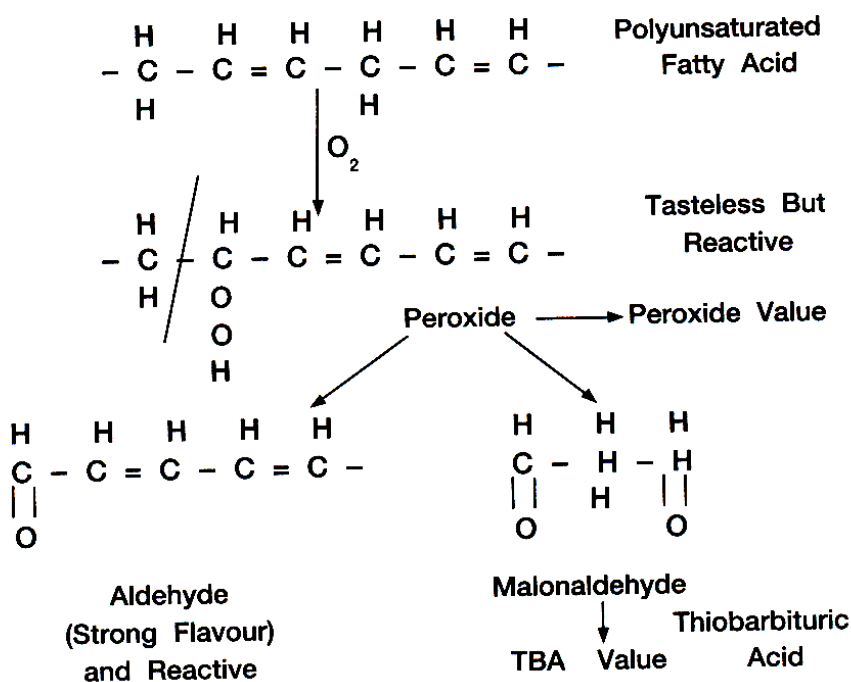
การออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลา

กระบวนการออกซิเดชันของไขมันเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและก่อให้เกิดกลไกที่ไม่พึงประสงค์ต่อผู้บริโภค กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย ทั้งชนิดที่ไม่ต้องใช้เอนไซม์หรือใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา กลไกพื้นฐานของการเกิดออกซิเดชันของไขมันประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่สำคัญ คือขั้นเริ่มต้น (initiation) ขั้นแพร่ขยาย (propagation) และขั้นหยุดยั้ง (termination) ขั้นตอนโดยสรุปของการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อสัตว์แสดงดังรูปที่ 1 ปรากฏการณ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอก เช่น ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อ ความเข้มข้นของโปรออกซิแดนท์ (prooxidants) เหล็ก ไมโอโกลบิน เอนไซม์ ฟีเอช อุณหภูมิ ความแรงอ็อกซิเจน และออกซิเจน เป็นต้น (Chaijan และคณะ, 2006) การออกซิเดชันของไมโอโกลบินและไขมันมักเกิดขึ้นพร้อมกัน เหล็กที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน ซึ่งมีความเข้มข้นสูงในเนื้อสัตว์สามารถทำหน้าที่เป็นโปรออกซิแดนท์ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการออกซิเดชันของไขมัน เช่น แอลดีไฮด์ สามารถเหนี่ยวนำการจับตัวกัน (cross-linking) ของโปรตีนกล้ามเนื้อ และส่งผลเสียต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน Foegeding และคณะ (1996) รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของไขมันในกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นภายหลังการตายของสัตว์มักเกิดขึ้นรวดเร็วในปลามากกว่าเนื้อสัตว์อื่น ๆ ทั้งนี้เป็นเพราะในปลามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่า จึงสามารถเกิดการออกซิเดชันได้ดีและรวดเร็วกว่า ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลีกรสชาติและเนื้อสัมผัสได้มากกว่า

กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ที่เกิดขึ้นในเนื้อปลาระหว่างการย่อยสลายของไขมัน รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไขมันมีส่วนทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อของปลาเกิดการเปลี่ยนแปลงได้มากกว่าโปรตีนกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก การย่อยสลายของไขมัน (lipolysis) ในกล้ามเนื้อสามารถเกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์ไลเปส (lipase) และ ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะเร่งการย่อยสลาย (hydrolysis) ของไขมันและฟอสโฟลิปิดตามลำดับ การย่อยสลายนี้นำไปสู่การผลิตเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล การออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นภายหลังการตายของสัตว์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความเข้มข้นของโปรออกซิแดนท์ เช่น เหล็ก ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไขมัน ชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ ชนิดของกล้ามเนื้อ และเอนไซม์บางชนิดที่สามารถเร่งการออกซิเดชันของไขมัน เช่น ไลพอกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยทั่วไปแล้วเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะมีสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ (natural antioxidants) ทำหน้าที่ต้านหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ เช่น วิตามินอีหรือโทโคเฟอรอล (tocopherol) ไคโรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดีนเป็นองค์ประกอบ เช่น คาร์โนซีน

(carnosine) เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น (Foegeding และคณะ, 1996)

ไขมันในปลาทะเลประกอบด้วยกรดไขมัน EPA และ DHA ประมาณร้อยละ 90 ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว นอกจากนี้ไขมันปลายังประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอื่นๆ ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลานั้นๆ กรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน ไขมันสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิปิด โดยไตรกลีเซอไรด์จะพบอยู่ในรูปของหยดน้ำมันทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ส่วนฟอสโฟลิปิดจะพบอยู่ในลักษณะ bilayer ในเมมเบรนของเซลล์ นอกจากนี้ก็ยังมีโมเลกุลของออกซิเจนที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญเช่นกัน ส่วนเหล็กและทองแดงก็เป็นโลหะที่มีบทบาทสำคัญในเนื้อเยื่อของสัตว์ โดยทำหน้าที่เป็นโปรออกซิแดนท์ (สุทธวัณน์ เบญจกุล, 2548)



รูปที่ 1 กระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ
ที่มา สุทธวัณน์ เบญจกุล (2548)

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

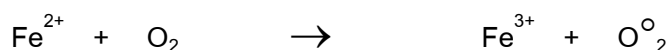
1. ออกซิเจน

ปกติแล้วออกซิเจนไม่ค่อยจะว่องไวต่อปฏิกิริยา เพราะมี unpaired electron 2 คู่ ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการทำปฏิกิริยากับโมเลกุล (spin-forbidden) ซึ่งอยู่ในลักษณะ ground state โดยโลหะทรานซิชันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทั้งชนิดที่ใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ ออกซิเจนชนิดทริฟเลท (Triplet oxygen) มีความเฉื่อยต่อปฏิกิริยา แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการรีดักชัน (reduction products) จะมีความว่องไวสูงขึ้น

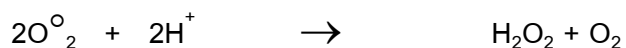
2. โลหะทรานซิชัน

ปริมาณเหล็กในกล้ามเนื้อปลาแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่อาศัย ปลาที่มีเนื้อขาวมีความเข้มข้นของเหล็กต่ำกว่าปลาที่มีเนื้อสีคล้ำ เหล็กส่วนใหญ่ที่พบมักเป็นองค์ประกอบของเมดสี คือ ฮีโมโกลบิน และไมโอโกลบิน นอกจากนี้ยังมีโปรตีนชนิดอื่น เช่น ไซโทโครม (cytochrome) ภายหลังการตาย cytochrome C ซึ่งสามารถละลายน้ำได้จะผ่านเข้าไปในไซโทพลาสซึม ถ้าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สูงเพียงพอจะมีผลให้อนุภาคเหล็กถูกปลดปล่อยออกจากฮีโม ในขณะที่มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่ำ เหล็กในฮีโมจะถูกกระตุ้น

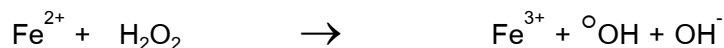
โลหะทรานซิชันที่อยู่ในลักษณะอนุมูลอิสระนั้น unpaired electron สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับโมเลกุลของออกซิเจน ดังนั้นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) สามารถกระตุ้นออกซิเจนและให้ซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2^\bullet$) ดังนี้



ซูเปอร์ออกไซด์ สามารถเปลี่ยนแปลงโดยผ่านกระบวนการ dismutation ซึ่งเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติหรือเกิดจากเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส ดังนี้



ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอะตอมของเฟอร์รัส เกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิดอิสระ ดังนี้



อนุมูลอิสระไฮดรอกซิดอิสระเหล่านี้เป็นตัวเริ่มต้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาหลายชนิดเกิดได้ดีที่ pH 6.5-6.9 ซึ่งเป็น pH ของเนื้อปลา ภายหลังการตาย และยังสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ $0-6^\circ\text{C}$ แต่ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กิจกรรมจะเกิดขึ้นได้น้อยที่อุณหภูมิต่ำ โดยเฉพาะในส่วนของเมมเบรนของเนื้อเยื่อปลาที่เป็นแหล่งของไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงในปริมาณที่สูงกว่าในไขมันทั่วไป ซึ่งเมมเบรนจะ

เป็นแหล่งไขมันหลักในปลาเนื้อขาว ส่วนในปลาเนื้อดำ พบว่ามีไมโทคอนเดรียเป็นองค์ประกอบร้อยละ 40-45 ของปริมาตรเซลล์

3. เหล็กที่เป็นองค์ประกอบของฮีม

เมทไมโอโกลบินหรือเมทฮีโมโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนฮีมที่เหล็กเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่สามารถก่อให้เกิดการเร่งออกซิเดชัน ซึ่งการเกิดขึ้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นโปรตีนฮีม แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันขึ้น

4. Singet oxygen

Singet oxygen ที่เกิดจากกระบวนการ photosensitization นี้จะอยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและมีพลังงานที่สูง เรียกโมเลกุลบางชนิดที่สามารถดูดซับแสงแล้วเปลี่ยนเป็นสภาวะถูกกระตุ้นนี้ว่า sensitizers สารประกอบธรรมชาติที่เป็น sensitizer ประกอบด้วยโรโบฟลาวิน และพอร์ไฟริน (porphyrin)

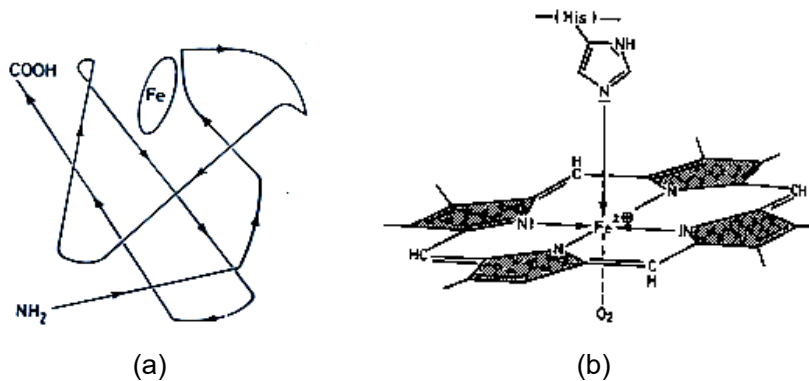
5. เอนไซม์

ไลพอกซีจีเนส (lipoxygenase) หรือไดออกซีจีเนส (dioxygenase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเหงือก หนัง และไขของปลา เอนไซม์ในหนังสามารถก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของไขมันในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อได้ ไลพอกซีจีเนสสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดไขมันที่เอสเตอร์ไฟด์กับกลีเซอรอลเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันอิสระโดยเอนไซม์สามารถปนเปื้อนลงไปในเนื้อปลาจากผิวหนัง โดยเฉพาะในขั้นตอนการนำกระดูกออก ในกระบวนการผลิตปลาสดหรือซูริมิ

ไมโอโกลบิน

ไมโอโกลบินเป็นโปรตีนทรงกลมที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16.8 กิโลดาลตันประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนเรียกว่า โกลบิน (globin) และส่วนที่เป็นรงควัตถุเรียกว่า ฮีม (heme) โดยที่ส่วนของฮีมจะซ่อนตัวอยู่ภายในโครงสร้างของโกลบินซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และฮีมจะต่ออยู่กับโกลบินตรงตำแหน่งหมู่ имиไดazole (imidazole) ของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (รูปที่ 2) โมเลกุลของไมโอโกลบินสามารถจับกับออกซิเจนแบบย้อนกลับได้จึงมีบทบาทสำคัญต่อการลำเลียงและเก็บรักษาออกซิเจนให้แก่กล้ามเนื้อ ซึ่งการจับตัวกับออกซิเจนของไมโอโกลบินจะเป็นเส้นโค้งแบบไฮเพอร์โบลา (hyperbolic curve) ไมโอโกลบินประกอบด้วยโครงสร้างวงแหวนพอร์ไฟริน (porphyrin ring) ที่ประกอบด้วยอะตอมของเหล็ก วงแหวนพอร์ไฟรินประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน 4 ตำแหน่งจัดเรียงตัวในแนวระนาบ ตำแหน่งที่ 5 จะจับกับฮิสทีดีนของโปรตีนทรงกลม (globular protein) ตำแหน่งที่ 6 ใช้สำหรับจับออกซิเจนหรือโมเลกุลขนาดเล็กอื่น ๆ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อสีของเนื้อ ปริมาณไมโอโกลบินขึ้นกับชนิดของกล้ามเนื้อ กิจกรรมของกล้ามเนื้อ ปริมาณออกซิเจน การไหลเวียนของเลือด อายุของสัตว์ โดยทั่วไปมักพบในกล้ามเนื้อดำ ในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตเหล็กที่พบ

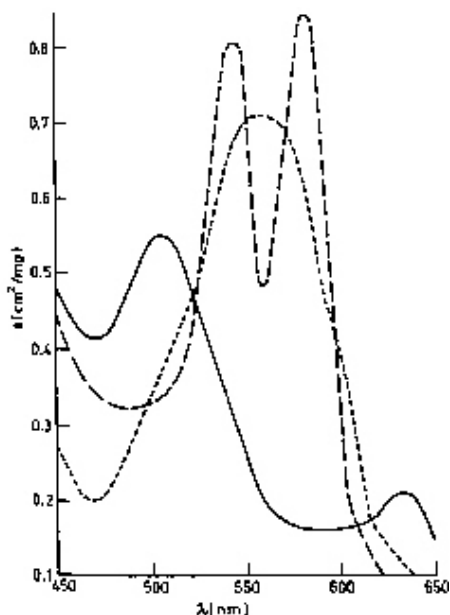
ประมาณร้อยละ 10 จะอยู่ในรูปไมโอโกลบิน ส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปฮีโมโกลบินและบางส่วนอีกเล็กน้อยจะอยู่ในรูปไซโตโครมหรือโปรตีนที่สะสมเหล็กอื่นๆ แต่เมื่อผ่านการเอาเลือดออกเป็นอย่างดีจะพบว่าเหล็กที่พบในสัตว์เหล่านั้นส่วนใหญ่ร้อยละ 95 จะอยู่ในรูปไมโอโกลบิน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีของกล้ามเนื้อส่วนใหญ่มิฉะนั้นขึ้นอยู่กับไมโอโกลบินเป็นสำคัญ (Belitz และคณะ, 2004)



รูปที่ 2 โครงสร้างสามมิติของไมโอโกลบิน (a) และการจับตัวของเหล็กกับโกลบินและออกซิเจนในโมเลกุลของไมโอโกลบิน (b)

ที่มา ดัดแปลงจาก Belitz และคณะ (2004)

ลักษณะสีที่ปรากฏของเนื้อสัตว์เป็นผลมาจากการดูดกลืนแสงของไมโอโกลบินและการกระจายแสงของเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งสีแดงสดของเนื้อเป็นผลมาจากการดูดกลืนแสงที่สูงและมีการกระจายแสงที่ต่ำ คือออกซีไมโอโกลบินหรือไมโอโกลบินมีสีม่วงแดง สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 555 นาโนเมตร ในขณะที่ออกซีไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดงสดจะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 542 และ 580 นาโนเมตร แต่เมื่อไมโอโกลบินเกิดการออกซิเดชันจนกลายเป็นเมทไมโอโกลบินซึ่งมีสีน้ำตาลจะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 505 และ 635 นาโนเมตร (รูปที่ 3) สารประกอบบางชนิด เช่น CO, NO, N_3^- และ CN^- สามารถจับกับไมโอโกลบินได้ เช่นเดียวกันกับออกซิเจนจึงสามารถให้สีและรูปแบบการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกันกับออกซีไมโอโกลบิน การจับตัวของออกซิเจนกับไมโอโกลบินเกิดขึ้นได้ดีเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเหล็กอิสระที่หลุดออกมาจากโกลบิน (free heme, Fe^{2+} -protophophyrin) จะไม่สามารถจับกับออกซิเจนได้แต่สามารถเกิดการออกซิเดชันได้อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นฮีมิน (hemin: Fe^{3+} -protophophyrin) (Edder, 1996)



รูปที่ 3 รูปแบบการดูดกลืนแสงของดีออกซีไมโอโกลบิน (.....) ออกซีไมโอโกลบิน (- - -) และเมทไมโอโกลบิน (—)
ที่มา Eder (1996)

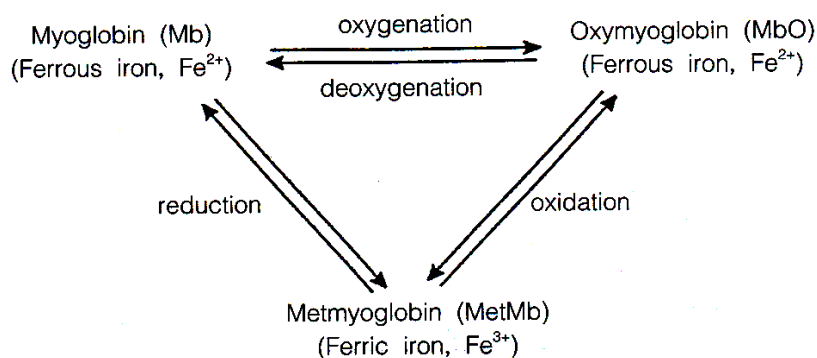
ไมโอโกลบินในเนื้อปลา

ไมโอโกลบินจากปลา มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) แตกต่างจากไมโอโกลบินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยไมโอโกลบินของปลาประกอบด้วยซิสเตอีน ในกรดอะมิโน 146 ตัว พบว่ากรดอะมิโนจำนวน 79-85 ตัว ในลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) จะแตกต่างจากไมโอโกลบินจากสัตว์อื่น (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไมโอโกลบิน

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไมโอโกลบินก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลาในระหว่างเก็บรักษา โดยไมโอโกลบินจะเปลี่ยนเป็นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ซึ่งมีสีน้ำตาล (รูปที่ 4) นอกจากนี้ไมโอโกลบินยังทำหน้าที่เป็นโปรออกซิแดนซ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมัน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548) ไมโอโกลบินในปลามีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สูงกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 2.5 เท่า โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงและพีเอชต่ำ เช่น ในสภาวะการเก็บรักษาปลาที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณสูงเพื่อชะลอการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำมีผลเร่งการเกิดปฏิกิริยาของออกซิเดชันของออกซีไมโอโกลบินไปเป็นเมทไมโอโกลบินและมีผลให้สีเปลี่ยนแปลงไป ระหว่างการเก็บรักษาปลาทูน่าในสภาวะแช่แข็ง พบว่ามักเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลาอันเป็นผลจากการเกิดเมทไมโอโกลบิน อุณหภูมิการเก็บรักษามีผลโดยตรงต่ออัตราการเกิดเมทไมโอโกลบิน โดยการ

เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -33°C สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ พลังงานกระตุ้น (apparent activation energy, E_a) ในการเกิดเมทไมโอโกลบินในพลาสติกแพคเกจมีค่าเท่ากับ 25.2, 90.5 และ 18.3 kcal/mole เมื่อเก็บรักษาชิ้นปลาที่อุณหภูมิ -2 , -2 ถึง -5 และ -5°C ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงสีของปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำหรือเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งสามารถชะลอได้โดยการให้ผิวหน้าของชิ้นปลาสัมผัสกับออกซิเจนที่ระดับต่ำ ซึ่งสามารถเปลี่ยนออกซิไมโอโกลบินเป็นไมโอโกลบิน หลังจากนั้นจึงให้ชิ้นปลาสัมผัสกับคาร์บอนมอนอกไซด์ปริมาณน้อยเพื่อเปลี่ยนไมโอโกลบินไปเป็นคาร์บอกซิไมโอโกลบิน (carboxymyoglobin) ซึ่งมีความทนทานต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าออกซิไมโอโกลบิน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของไมโอโกลบิน

ที่มา สุทธวัฒน์ เบญจกุล (2548)

การออกซิเดชันอย่างช้า ๆ แบบต่อเนื่องของไมโอโกลบินทำให้ไมโอโกลบินกลายเป็นเมทไมโอโกลบินซึ่งมีสีน้ำตาล การเกิดออกซิเดชันดังกล่าวเรียกว่า การเกิดออโตออกซิเดชัน (autooxidation) หรือการออกซิเดชันด้วยตัวเอง ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นมาได้เมื่อค่าพีเอชลดลง ซึ่งในระหว่างที่ค่าพีเอชลดลงนั้นจะทำให้โกลบินและฮีมเกิดการหลุดออกจากกัน (dissociation) จึงทำให้ฮีมง่ายต่อการเกิดออกซิเดชันมากขึ้น ภายหลังที่สัตว์ตาย เนื้อสัตว์จะมีพีเอชประมาณ 7 และจะทำให้โครงสร้างของไมโอโกลบินมีเสถียรภาพ แต่เมื่อกาลัมเนื้อเกิดการไกลโคไลซิสซึ่งจะส่งผลให้เนื้อสัตว์มีพีเอชจะลดลงเป็น 5-6 จะทำให้ไมโอโกลบินเกิดการออโตออกซิเดชันได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้แล้วเสถียรภาพของไมโอโกลบินยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิอีกด้วย เช่น เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า เนื้อสดที่มีพีเอชเท่ากับ 5 จะสามารถเก็บรักษาที่ 25°C ได้ประมาณ 2.8 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บรักษาที่ 0°C จะสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงสีได้นานถึง 5 วัน (Foegeding และคณะ, 1996)

ระเบียบวิธีวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกล้ามเนื้อปลาโอ และปลาดุก

การทดลองครั้งนี้ใช้ปลา 2 ชนิด คือ ปลาโอ (frigate mackerel; *Auxis thazard*) และปลาดุก (Gunther's walking catfish; *Clarias macrocephalus*) เพื่อเป็นตัวแทนของปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืด ที่มีปริมาณไขมันสูง ตามลำดับ โดยใช้ตัวอย่างปลาชนิดละ 5 กิโลกรัม นำมาล้างทำความสะอาดโดยใช้น้ำเย็น (4°C) จากนั้นทำการแล่เนื้อปลาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กล้ามเนื้อดำ และกล้ามเนื้อขาว ซึ่งจะทำการศึกษาการแยกกล้ามเนื้อดำได้จากบริเวณเส้นข้างลำตัวของปลา (lateral line) และใช้กล้ามเนื้อทั่วไป (ordinary muscle) ทั้งส่วนบน (dorsal muscle) และส่วนล่าง (ventral muscle) เป็นตัวแทนของกล้ามเนื้อขาว แต่จะไม่นำส่วนของกล้ามเนื้อท้อง (belly muscle) มาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ นำกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาวที่แยกได้มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ จากนั้นทำการสุมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกล้ามเนื้อ ได้แก่

1. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น ไขมันรวม โปรตีน และเถ้า (proximate composition) ตามวิธีการของ AOAC (2000)
2. การแยกส่วนโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งทำการแยกโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายออกเป็น 5 ส่วน ได้แก่ สารประกอบในโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน โปรตีนซาร์โคพลาสมิก โปรตีนไมโอไฟบริล โปรตีนที่ละลายได้ในด่าง และสโตรมา ตามวิธีของ Hashimoto และคณะ (1975)
3. ตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (4% stacking gel และ 10% running gel) (Leammli, 1970)
4. ตรวจวัดพีเอช (Benjakul และคณะ, 1997)
5. วิเคราะห์ปริมาณไมโอโกลบินในกล้ามเนื้อปลาดุกด้วยการสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตรตามวิธีการของ Benjakul และ Bauer (2001) แล้วคำนวณความเข้มข้นของไมโอโกลบิน โดยใช้ millimolar extinction coefficient เท่ากับ 7.6
6. วิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิด ตามวิธีการของ Stewart (1980) และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามวิธีการของ Zheng และคณะ (2010)
7. ศึกษาเสถียรภาพของไขมันต่อการออกซิเดชันโดยการติดตามค่า Induction time ด้วยเครื่อง Rancimat
8. ตรวจวัดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (AOAC, 2000)
9. ตรวจวัดปริมาณเหล็ก คอปเปอร์ และเซเลเนียม ด้วยเครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrophotometer (ICP-OES) ตามวิธีการของ AOAC (2000) ซึ่งเหล็กและคอปเปอร์จัดเป็น prooxidants ที่สำคัญ ส่วนการวัดปริมาณเซเลเนียมก็เพื่อบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็น antioxidative enzyme ในกล้ามเนื้อ

10. วัดสี โดยวัดค่า L^* a^* และ b^* และรายงานค่าดัชนีสีแดง (redness index; a^*/b^*) ตามวิธีการของ Chaijan และคณะ (2005)

ตอนที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่นในกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุก ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 15 วัน

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่น ในกล้ามเนื้อดำ (dark muscle) กล้ามเนื้อขาว (ordinary muscle) และกล้ามเนื้อรวม (whole muscle) ของปลาโอและปลาดุก ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 15 วัน โดยเก็บรักษาตัวอย่างปลาสดแต่ละชนิด ในถุงโพลีเอทิลีนถุงละ 200 กรัม จำนวน 12 ถุง สำหรับการสุ่มตัวอย่างครั้งละ 3 ถุง จำนวน 4 ครั้ง (วันที่ 0 5 10 และ 15 ของการเก็บรักษา) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่นผิดปกติ ได้แก่

1. ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Lowry และ Tinsley, 1976)
2. ค่า peroxide value (PV) ตามวิธีการของ Shantha และ Decker (1994)
3. ค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ตามวิธีการของ Buege และ Aust (1978)
4. ค่า conjugated diene ตามวิธีการของ Undeland และคณะ (1998) โดยนำไขมันที่สกัดได้มาละลายใน isooctane แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร
5. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ oxymyoglobin และ metmyoglobin โดยทำการสกัดไมโอโกลบินด้วย 40 mM phosphate buffer, pH 6.8 ตามวิธีการของ Chaijan และคณะ (2005)
6. ปริมาณ heme iron และ non-heme iron (Benjakul และ Bauer, 2001)
7. วัดสีของเนื้อปลา โดยวัดค่า L^* a^* และ b^* และรายงานค่าดัชนีสีแดง (redness index; a^*/b^*) (Chaijan และคณะ, 2005)
8. ค่าพีเอช (Benjakul และคณะ, 1997)
9. ค่า TVB โดยใช้วิธี Conway ตามวิธีการที่รายงานโดย Hasegawa (1987)
10. ปริมาณคาร์บอนิลของโปรตีนตามวิธีการของ Mercier และคณะ (2000)

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ของปลาโอและปลาดุก ในระบบจำลอง

1. สกัดและทำบริสุทธิ์ไมโอโกลบินจากกล้ามเนื้อดำของปลาโอ และปลาดุก ตามวิธีการของ Chaijan และคณะ (2007) จากนั้นทำการเตรียม ferrous myoglobin โดยการรีดิวซ์ด้วย sodium dithionite ตามวิธีการของ Millar และคณะ (1996)

2. สกัดไขมันจากกล้ามเนื้อรวมของปลาโอและปลาดุก ตามวิธีการของ Bligh และ Dyer (1959)

3. ศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระบบจำลอง lecithin - liposome (ดัดแปลงวิธีการของ Yin และ Faustman, 1994) ซึ่งเตรียมระบบจำลอง lecithin - liposome โดยการละลายเลซิธิน (8 mg/ml) กับไขมันจากกล้ามเนื้อปลา (4 mg/ml) ใน 40 mM phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นแบ่งชุดการทดลองเพื่อศึกษา ดังนี้

3.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ ferrous myoglobin และอุณหภูมิต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยทำการเติม ferrous myoglobin ที่ละลายอยู่ใน 40 mM phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 mM (ชุดควบคุมจะทำการเติมบัฟเฟอร์แทนไมโอโกลบิน) จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ในที่มีด ทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า conjugated diene และ TBARS ในเวลาที่ 0 30 60 90 120 150 และ 180 นาที โดยรายงานค่า conjugated diene ในรูปของ OD 234 nm และรายงานผลค่า TBARS ในรูปของ OD 532 nm จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของ ferrous myoglobin ที่ทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุดเพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 4 25 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงถึงการเก็บรักษาแบบแช่เย็น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และสภาวะเร่งตามลำดับ เป็นเวลา 180 นาที ในที่มีด ทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า conjugated diene และ TBARS เมื่อครบ 180 นาที

3.2 ศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome เช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่จะทำการคัดเลือกสภาวะที่ทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุดจากข้อ 3.1 มาศึกษาในขั้นตอนนี้ (ความเข้มข้นของ ferrous myoglobin, อุณหภูมิ, เวลา) ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้บัฟเฟอร์พีเอช 5 6 7 และ 8 เพื่อเป็นตัวแทนพีเอชของกล้ามเนื้อในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ physiological pH (พีเอชประมาณ 7.0), post mortem pH ที่ปกติ (มีค่า ultimate pH ประมาณ 6-7), สภาวะที่เกิดไกลโคไลซิสมากกว่าปกติ (ultimate pH ประมาณ 5-6) และสภาวะที่เกิดไกลโคไลซิสน้อยกว่าปกติ (ultimate pH ประมาณ 7-8) จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวัดค่า conjugated diene และ TBARS เช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

3.3 ศึกษาผลของเกลือต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome เช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไมโอโกลบิน

เวลา อุณหภูมิ ที่มีผลแรงการออกซิเดชันของไขมันสูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.1 และเลือกใช้พีเอชที่ให้ผลในการเร่งออกซิเดชันสูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.2 แต่ในการทดลองขั้นตอนนี้จะทำการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปร้อยละ 0, 0.25, 2.5 และ 5 ของปริมาตรของระบบจำลอง จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวัดค่า conjugated diene และ TBARS เช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

3.4 ศึกษาผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome เช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่จะทำการเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงไปร้อยละ 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 12.5 และ 25 ของปริมาตรของระบบจำลอง เพื่อจำลอง Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\circ$) โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไมโอโกลบิน เวลา อุณหภูมิ ที่มีผลแรงการออกซิเดชันของไขมันสูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.1 และเลือกใช้พีเอชที่ให้ผลในการเร่งออกซิเดชันสูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.2 จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวัดค่า conjugated diene และ TBARS เช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

3.5 ศึกษาผลของ EDTA ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome เช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไมโอโกลบิน เวลา อุณหภูมิ ที่มีผลแรงการออกซิเดชันของไขมันสูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.1 และเลือกใช้พีเอชที่ให้ผลในการเร่งออกซิเดชันสูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.2 แต่ในการทดลองขั้นตอนนี้จะทำการเติม EDTA ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบจำลองเท่ากับ 0, 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของปริมาตรของระบบจำลอง (ดัดแปลงจาก Richards และ Li , 2004) จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวัดค่า conjugated diene และ TBARS เช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกล้ามเนื้อปลาโอ และปลาดุก

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุก พบว่า กล้ามเนื้อปลาโอและกล้ามเนื้อปลาดุกมีคุณลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ที่แตกต่างกัน และองค์ประกอบเหล่านี้ในปลาชนิดเดียวกันจะมีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของกล้ามเนื้อ (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกล้ามเนื้อ พบว่า กล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด มีความชื้นเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 71.55-75.68 ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ โดยกล้ามเนื้อดำของปลาดุกมีความชื้นมากที่สุด ($p < 0.05$) โดยทั่วไปแล้วกล้ามเนื้อปลาโอทั้งในส่วนเนื้อดำและเนื้อขาวมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุก ($p < 0.05$) และในทางตรงกันข้าม กล้ามเนื้อปลาดุกโดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อดำมีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาโอ ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณเถ้าพบว่ากล้ามเนื้อปลาทั้งหมดมีปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.08-1.21 จากการแยกส่วนโปรตีนกล้ามเนื้อโดยอาศัยความสามารถในการละลาย พบว่า โปรตีนไมโอไฟบรินเป็นโปรตีนหลักที่พบในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด และปริมาณโปรตีนไมโอไฟบรินพบได้

มากกว่าในกล้ามเนื้อปลาโอเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกทั้งในส่วนของกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาว ($p < 0.05$) กล้ามเนื้อขาวของปลาโอประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen) สูงสุด ($p < 0.05$) รองลงมาคือ กล้ามเนื้อดำของปลาโอ และกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิดของปลาดุก ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนซาร์โคพลาสมิกในกล้ามเนื้อปลา สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ กล้ามเนื้อดำของปลาโอ > กล้ามเนื้อขาวของปลาโอ > กล้ามเนื้อดำของปลาดุก > กล้ามเนื้อขาวของปลาดุก ส่วนปริมาณโปรตีนสโตรมาซึ่งเป็นโปรตีนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบว่ากล้ามเนื้อดำมีปริมาณสูงกว่ากล้ามเนื้อขาวในปลาทั้ง 2 ชนิด โดยพบมากที่สุดที่กล้ามเนื้อดำของปลาโอ ($p < 0.05$) สำหรับปริมาณโปรตีนที่ละลายในต่าง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนไมโอไฟบริลและซาร์โคพลาสมิกที่สูญเสียสภาพธรรมชาติ พบว่า กล้ามเนื้อขาวของปลาดุกมีปริมาณโปรตีนที่ละลายในต่างสูงที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสีที่เป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อปลาซึ่งได้แก่ ไมโอโกลบินและแคโรทีนอยด์ พบว่า ปลาโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้ามเนื้อดำมีปริมาณไมโอโกลบินสูงกว่าปลาดุกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาวของปลาโอมีปริมาณไมโอโกลบินสูงกว่าปลาดุกประมาณ 2.5 เท่า และ 8.25 เท่า ตามลำดับ ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ พบว่า ปลาดุกทั้งในส่วนของกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาวมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าปลาโอประมาณ 12.6 เท่า และ 33.6 เท่า ตามลำดับ ปริมาณฟอสโฟลิปิดในกล้ามเนื้อขาวของปลาโอมีค่าสูงสุด รองลงมาคือ กล้ามเนื้อดำของปลาโอ กล้ามเนื้อขาวของปลาดุก และกล้ามเนื้อดำของปลาดุก ($p < 0.05$) ตามลำดับ ส่วนปริมาณกลีโคไซด์ยิมคอลลอยด์ พบว่า กล้ามเนื้อปลาโอทั้งในส่วนกล้ามเนื้อดำและกล้ามเนื้อขาวมีค่าสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุก ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาปริมาณแร่ธาตุได้แก่ เหล็ก ทองแดง และเซเลเนียมซึ่งมีบทบาทต่อการเกิดออกซิเดชันขององค์ประกอบในกล้ามเนื้อปลา พบว่า กล้ามเนื้อดำของปลาโอมีแร่ธาตุเหล่านี้เป็นองค์ประกอบมากที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาค่าพีเอช พบว่า กล้ามเนื้อขาวของปลาทั้ง 2 ชนิด มีค่าสูงกว่ากล้ามเนื้อดำ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณารูปแบบของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 5) พบว่า ไมโอซินเส้นหนัก และ แอกติน เป็นโปรตีนหลักที่พบในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด และพบความเข้มข้นของแถบโปรตีนดังกล่าวมีแนวโน้มสูงกว่าในกล้ามเนื้อขาวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้ามเนื้อปลาดุก จากการวัดค่าสีของกล้ามเนื้อปลาดุกและปลาโอ (ตารางที่ 2) พบว่า ปลาโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของกล้ามเนื้อดำ มีความสว่าง (L^*) และความเป็นสีเหลือง (b^*) ต่ำสุด มีความเป็นสีแดง (a^*) และดัชนีสีแดง (a^*/b^*) สูงสุด ($p < 0.05$) แสดงว่ากล้ามเนื้อดำของปลาโอมีสีแดงคล้ำที่สุด จากการวิเคราะห์เสถียรภาพของไขมันที่สกัดจากกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด ด้วยเครื่อง Rancimat (ตารางที่ 3) พบว่า ไขมันจากกล้ามเนื้อดำของปลาทั้ง 2 ชนิด มีค่า induction time ต่ำสุด แสดงให้เห็นว่ามีความไวต่อการเกิดออกซิเดชันได้เร็วกว่ากล้ามเนื้อขาว

Table 1 Chemical compositions of frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles

Compositions	Frigate mackerel		Catfish	
	Ordinary	Dark	Ordinary	Dark
Proximate composition				
(% wet muscle)				
Moisture	75.01±0.01c	73.70±0.27b	71.55±0.25a	75.68±0.27d
Crude protein	23.08±0.05c	23.21±0.19c	18.70±0.34b	18.19±0.09a
Crude fat	0.84±0.01a	1.90±0.00b	8.54±0.04d	5.05±0.02c
Ash	1.08±0.00a	1.19±0.00c	1.21±0.01d	1.09±0.01b
Nitrogenous composition				
(mg/g wet muscle)				
Non-protein nitrogen	5.19±0.01c	4.87±0.00b	2.29±0.01a	2.26±0.01a
Sarcoplasmic protein	10.67±0.12c	11.54±0.36d	9.30±0.06a	9.85±0.24b
Myofibrillar protein	30.81±1.28b	30.02±2.07b	21.99±0.73a	23.52±0.24a
Stromal protein	12.09±0.30b	17.44±1.03d	10.63±0.06a	16.12±0.12c
Alkaline-soluble protein	11.45±0.05b	11.49±0.06b	17.26±0.23c	8.99±0.00a
Carotenoid (mg/g)	0.13±0.01a	0.32±0.01b	4.37±0.07d	4.03±0.05c
Myoglobin (mg/g)	6.19±0.01c	7.52±0.02d	0.75±0.01a	3.01±0.03b
Phospholipid (mg/100g lipid)	23.07±2.97d	16.57±3.03c	9.69±0.61b	2.63±0.42c
Sodium chloride (%)	1.20±0.03c	1.15±0.03c	0.77±0.04a	0.90±0.09b
Minerals (mg/kg)				
Iron	5.67±0.45b	24.84±0.87c	2.88±0.10a	5.45±0.35b
Copper	0.57±0.02b	2.28±0.22c	0.55±0.13b	0.22±0.02a
Selenium	2.29±0.10b	3.23±0.11c	1.22±0.12a	1.23±0.10a
pH	6.16±0.16b	5.96±0.02a	6.86±0.01d	6.69±0.04c

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

**Different letters under the same row indicate significant differences ($P<0.05$).

Table 2 Color of frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles

Color	Frigate mackerel		Catfish	
	Ordinary	Dark	Ordinary	Dark
<i>L</i> * value	46.88±0.03b	35.35±0.15a	48.61±0.20c	48.43±0.16c
<i>a</i> * value	8.44±0.04b	9.81±0.30c	7.53±0.11a	8.71±0.22b
<i>b</i> * value	13.02±0.05b	11.79±0.13a	25.09±0.11d	18.96±0.14c
Redness index	0.65±0.00c	0.83±0.03d	0.30±0.00a	0.46±0.01b

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

**Different letters under the same row indicate significant differences ($P<0.05$).

Table 3 Induction time of lipid extracted from frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles

Species	Muscle type	Induction time (hr)
Frigate mackerel	Ordinary	1.04±0.02b
	Dark	0.84±0.01a
Catfish	Ordinary	1.53±0.10c
	Dark	0.87±0.03a

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

**Different letters under the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

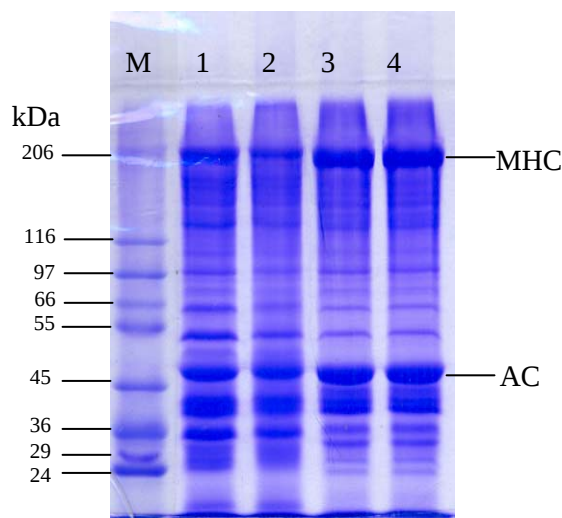


Figure 5 SDS-PAGE patterns of dark and ordinary muscles from Frigate mackerel and catfish under reducing condition. M, molecular weight standards; 1, Frigate mackerel ordinary muscle; 2, Frigate mackerel dark muscle; 3, catfish ordinary muscle; 4, catfish dark muscle. MHC, myosin heavy chain; AC, actin.

ตอนที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่นในกล้ามเนื้อปลาโอและปลาดุก ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 15 วัน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ไมโอโกลบิน สี และกลิ่น ในกล้ามเนื้อดำ (dark muscle) กล้ามเนื้อขาว (ordinary muscle) และกล้ามเนื้อรวม (whole muscle) ของปลาโอและปลาดุก ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 15 วัน พบว่าค่าพีเอช ของกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิดของปลาโอสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุกตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา และค่าพีเอชของกล้ามเนื้อปลาทั้งหมดเกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น (รูปที่ 6) ส่วนค่า TVB พบว่ากล้ามเนื้อปลาทุกชนิดจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการเก็บรักษาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้ามเนื้อดำของปลาโอ การเพิ่มขึ้นของค่า TVB แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของค่าที่ระเหยได้ เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเนื้อปลาและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ (รูปที่ 7) เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันอิสระซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของไขมันในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งแสดงในรูปที่ 8 พบว่า การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในกล้ามเนื้อปลาโอทั้งในส่วนกล้ามเนื้อดำ กล้ามเนื้อขาวและกล้ามเนื้อรวม ส่วนกล้ามเนื้อปลาดุกนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ากล้ามเนื้อปลาโอน่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและฟอสโฟไลเปสสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุกจึงทำให้เกิดการย่อยสลายของไขมันได้มากกว่า การติดตามการออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิดด้วยค่า conjugated diene (CD) (รูปที่ 9) peroxide value (PV)

(รูปที่ 10) และ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (รูปที่ 11) พบว่าค่า CD ของกล้ามเนื้อรวมและกล้ามเนื้อขาวของปลาดุก และกล้ามเนื้อขาวของปลาโอมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ค่า CD ของกล้ามเนื้อดำของปลาดุก กล้ามเนื้อรวมและกล้ามเนื้อดำของปลาโอมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงในช่วงหลังของการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่า อัตราการเกิดและอัตราการสลายตัวของ CD มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ ส่วนค่า PV พบว่าการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาของกล้ามเนื้อปลาทุกชนิดมีแนวโน้มเหมือนกันกล่าวคือเกิดการเพิ่มขึ้นในช่วง 5 วันแรกของการเก็บรักษาและลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดอายุการเก็บรักษา ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการเกิดและอัตราการสลายตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์จากการทดลองพบว่า กล้ามเนื้อดำของปลาทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มให้ค่า PV สูงสุดตลอดอายุการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่าไขมันที่เป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อดำมีความไวต่อการเกิดออกซิเดชันและทำให้เกิดการสะสมของผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันชั้นปฏิกิริยาในรูปไฮโดรเปอร์ออกไซด์สูงกว่ากล้ามเนื้อขาวและกล้ามเนื้อรวม ส่วนค่า TBARS ซึ่งบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ชั้นทุติยภูมิจากการออกซิเดชันของไขมัน พบว่ากล้ามเนื้อปลาโอทุกชนิดมีค่าสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาดุกตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่าไขมันในกล้ามเนื้อปลาโอมีความไวและมีอัตราการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าไขมันในกล้ามเนื้อปลาดุก เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในฮีม (heme iron) (รูปที่ 12) และปริมาณเหล็กที่ไม่ได้เป็นองค์ประกอบในฮีม (non-heme iron) (รูปที่ 13) ในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิดระหว่างการเก็บรักษา พบว่า ปริมาณ heme iron มีแนวโน้มลดลงในกล้ามเนื้อปลาโอ และมีแนวโน้มคงที่ในกล้ามเนื้อปลาดุก ส่วนปริมาณ non-heme iron พบว่ากล้ามเนื้อปลาโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อดำมีค่าสูงกว่าตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา และพบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ non-heme iron เพียงเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษาในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ oxymyoglobin (รูปที่ 14) และ metmyoglobin (รูปที่ 15) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า oxymyoglobin เกิดการออกซิเดชันไปเป็น metmyoglobin และเกิดการออกซิเดชันต่อเนื่องไปเป็นอนุพันธ์อื่น ๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้กล้ามเนื้อปลาทั้งหมดเกิดการเปลี่ยนแปลงสี จากการวิเคราะห์ดัชนีสีแดง (redness index) ของกล้ามเนื้อปลา (รูปที่ 16) พบว่า กล้ามเนื้อปลาดุกมีแนวโน้มของดัชนีสีแดงเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงดัชนีสีแดงจะเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในกล้ามเนื้อปลาโอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อดำ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 0-10 และเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 ของการเก็บรักษา ซึ่งสะท้อนถึงการเกิดสีคล้ำและการเปลี่ยนแปลงสีของกล้ามเนื้อปลาชนิดนี้ระหว่างการเก็บรักษา เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ protein carbonyl (รูปที่ 17) ซึ่งบ่งชี้การออกซิเดชันของโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด ระหว่างการเก็บรักษา พบว่า การเปลี่ยนแปลงมีแนวโน้มเหมือนกันคือ เกิดการเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการเก็บรักษา ลดลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในช่วงสุดท้าย

ของการเก็บรักษา ยกเว้นในกล้ามเนื้อขาวและกล้ามเนื้อรวมของปลาดุก ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นในช่วงแรก และลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนมีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ

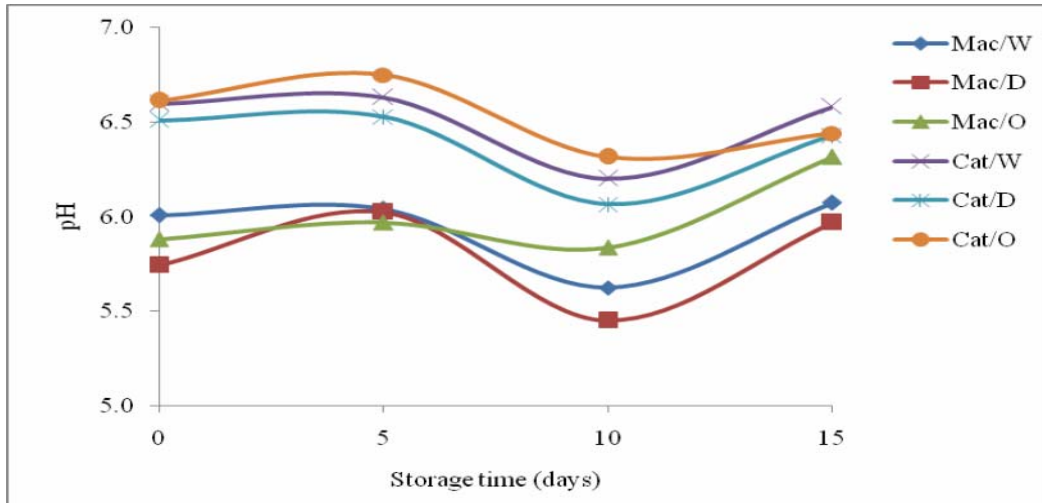


Figure 6 Changes in pH of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

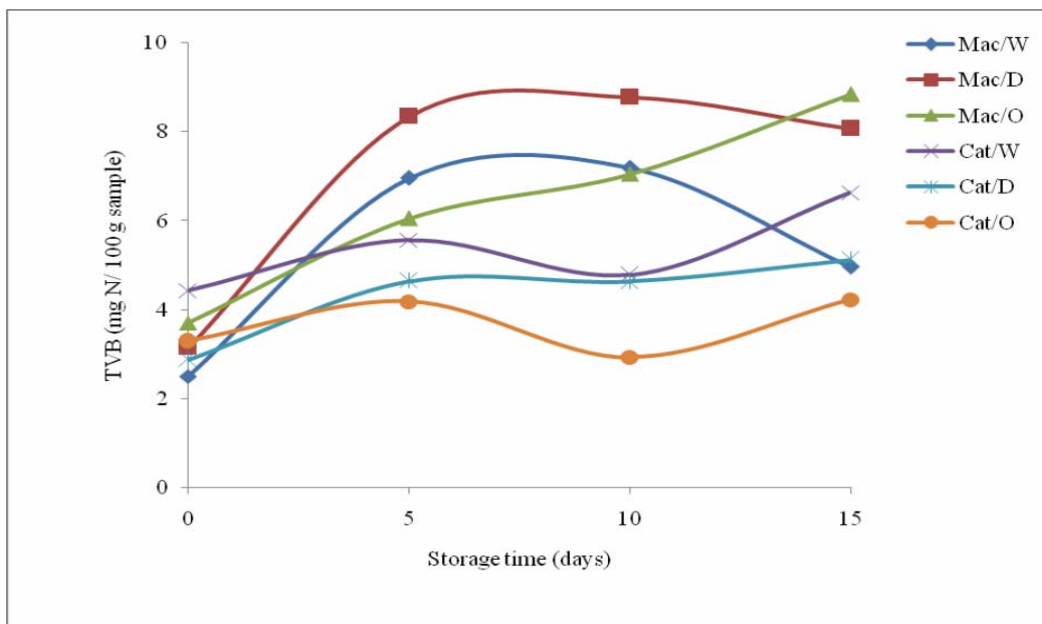


Figure 7 Changes in total volatile base nitrogen (TVB) content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

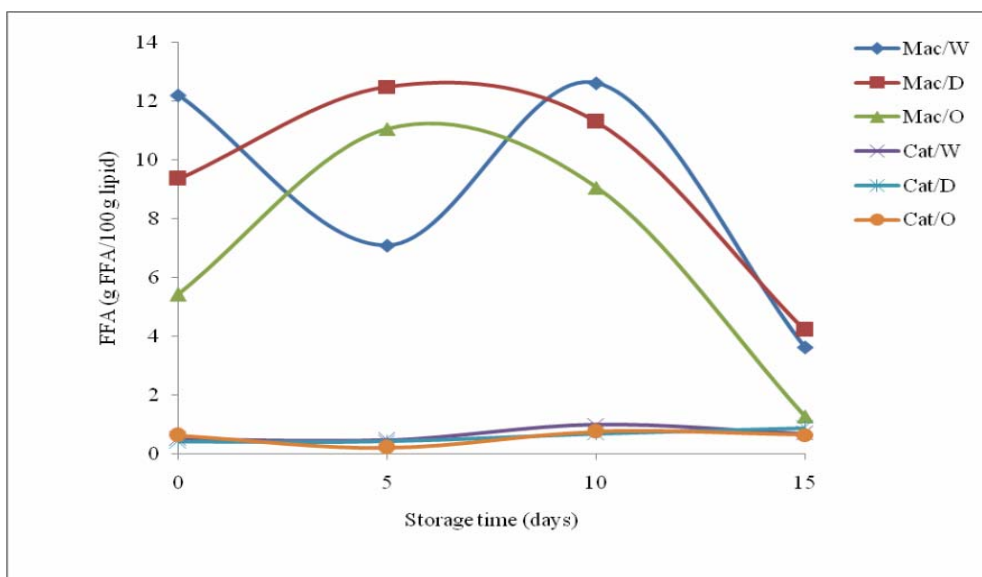


Figure 8 Changes in free fatty acid (FFA) content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

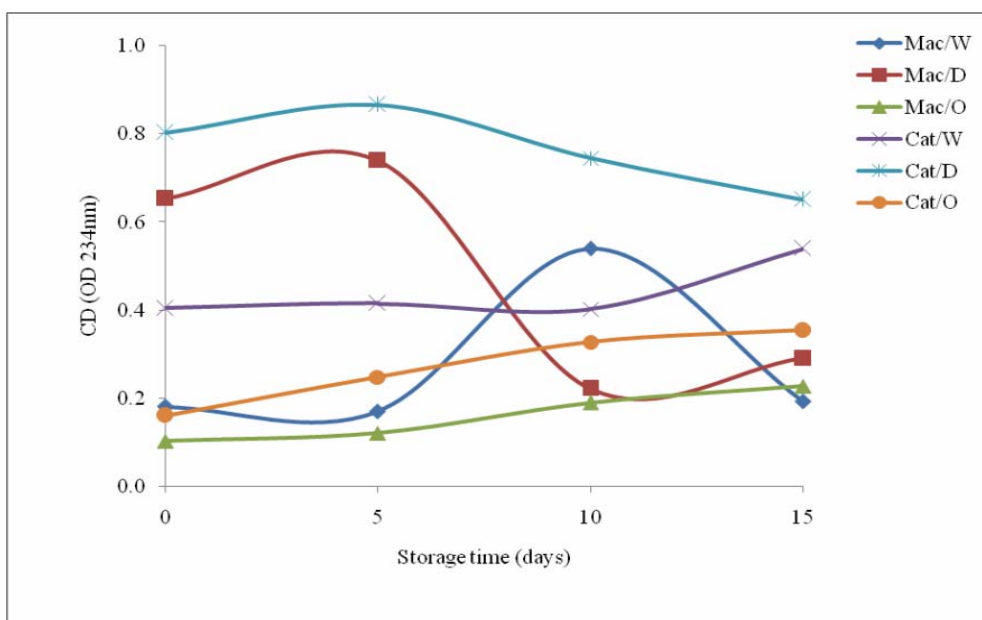


Figure 9 Changes in conjugated diene (CD) content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

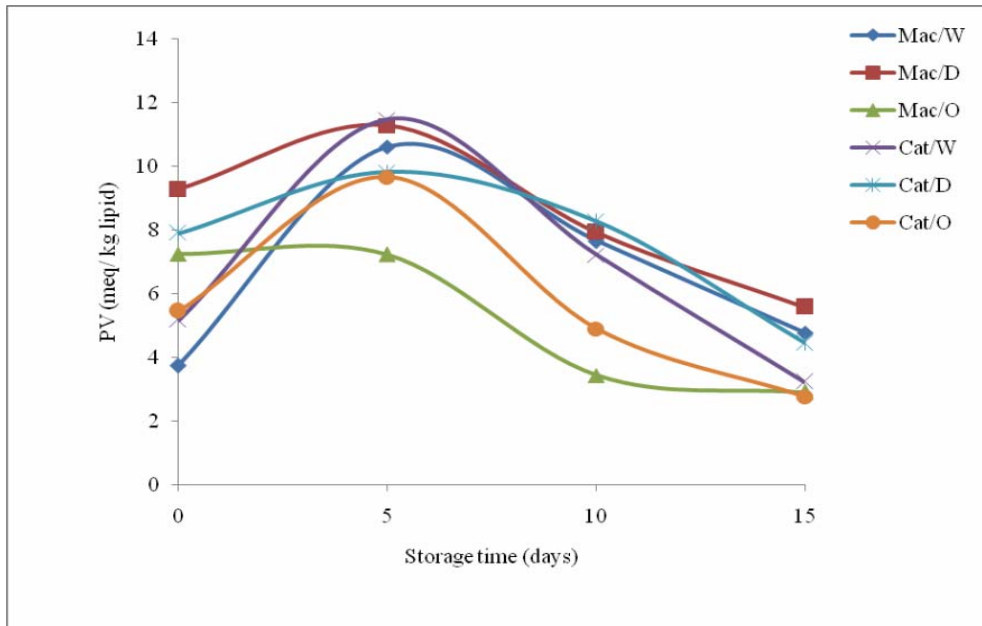


Figure 10 Changes in peroxide value (PV) of oil extracted from whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

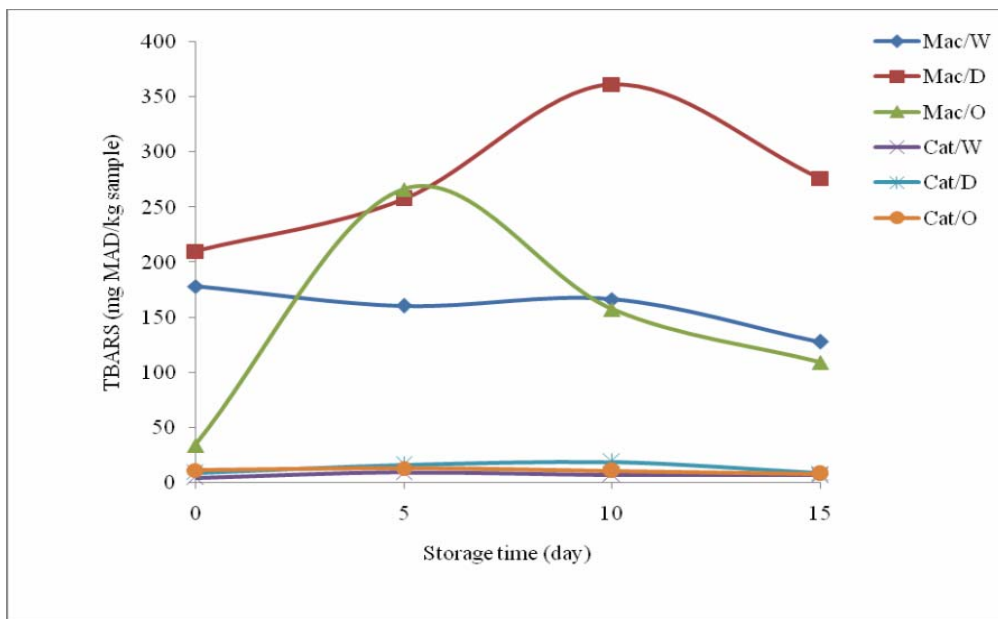


Figure 11 Changes in TBARS of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

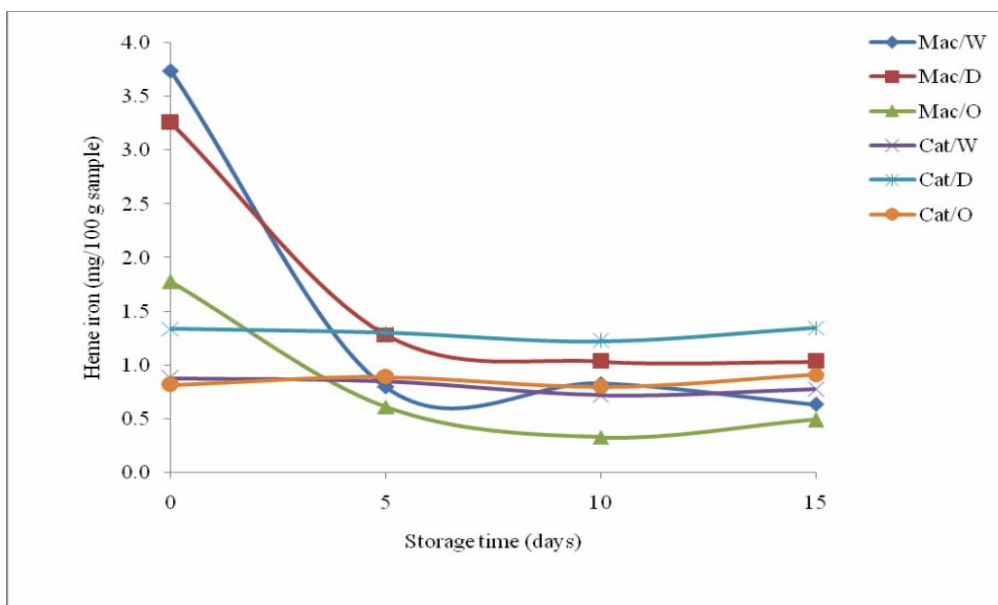


Figure 12 Changes in heme iron content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

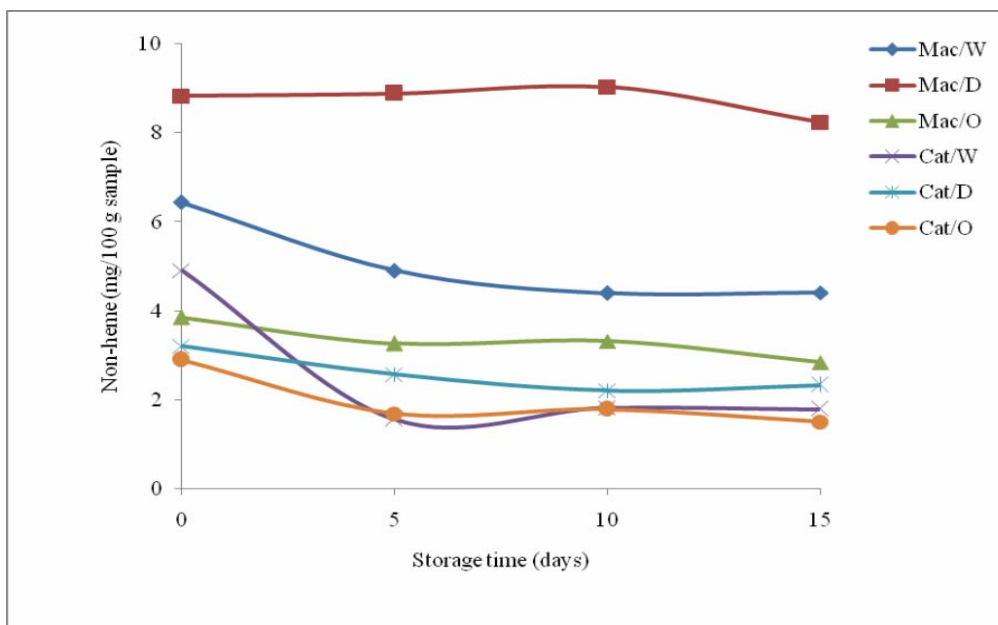


Figure 13 Changes in non-heme iron content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

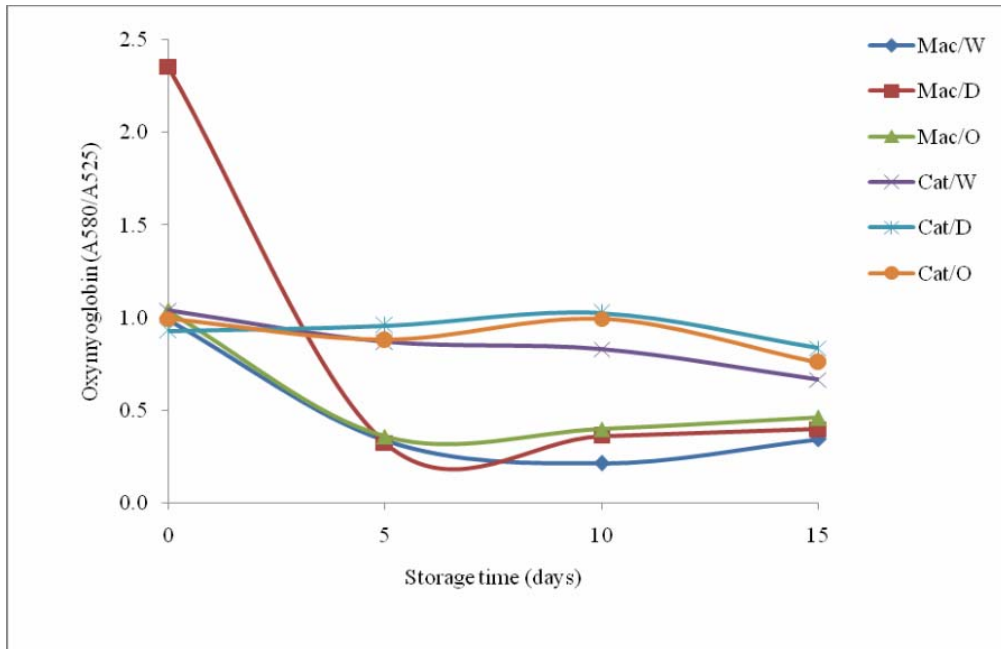


Figure 14 Changes in oxymyoglobin content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

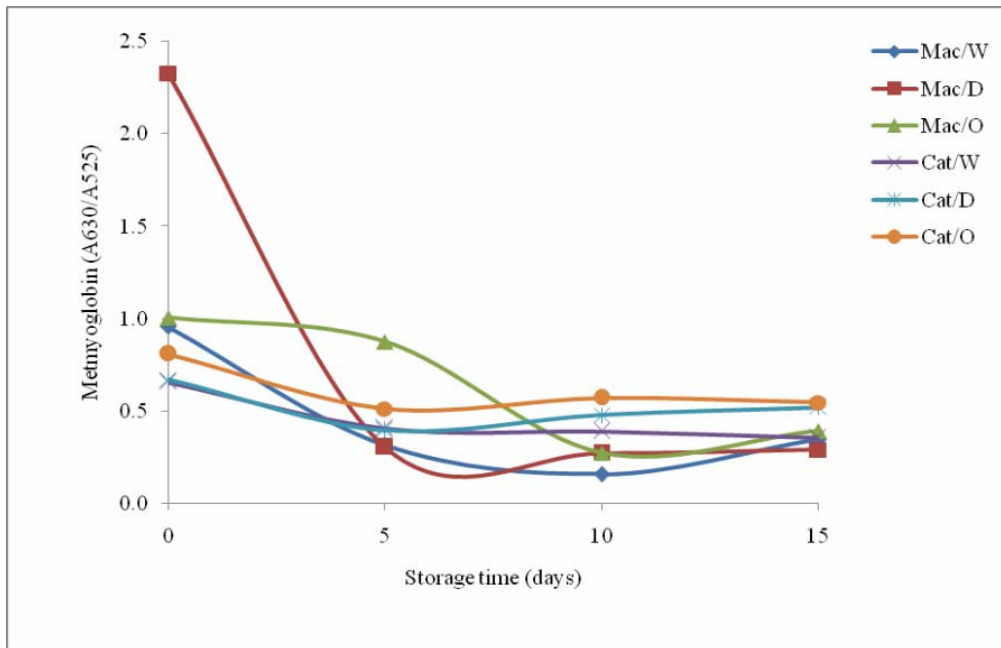


Figure 15 Changes in metmyoglobin content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

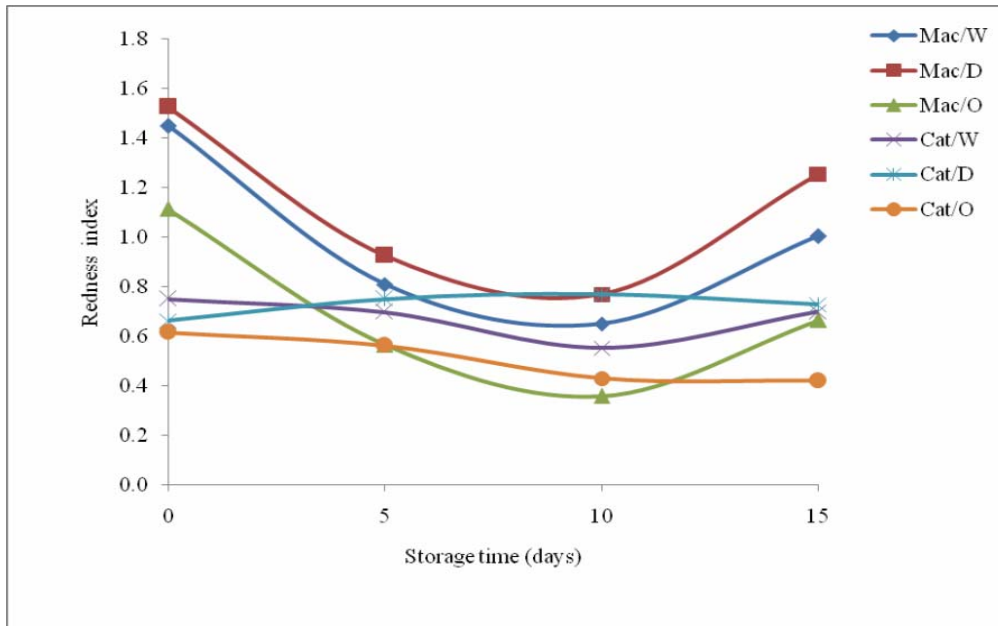


Figure 16 Changes in redness index of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

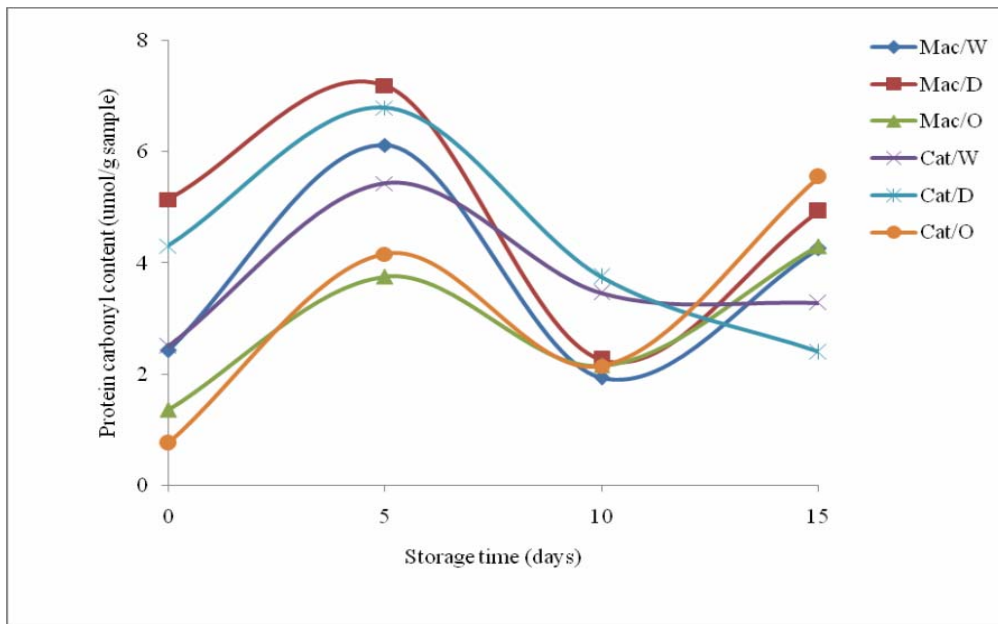


Figure 17 Changes in protein carbonyl content of whole (W), dark (D) and ordinary (O) muscles from Frigate mackerel (Mac) and catfish (Cat) during refrigerated storage (4°C) for 15 days.

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของไมโอโกลบินต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันของปลาโอและปลาดุกในระบบจำลอง

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ ferrous myoglobin ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันของปลาโอและปลาดุกในระบบจำลอง โดยการวิเคราะห์ค่า conjugated diene และ TBARS ในระหว่างการบ่ม พบว่า ค่า conjugated diene มีความผันแปรไม่แน่นอน เนื่องจากค่าดังกล่าวบ่งชี้การออกซิเดชันของไขมันในชั้นปฐภูมิซึ่งสารดังกล่าวอาจมีการสร้างและสลายตัวได้ในอัตราที่แตกต่างกันโดยไม่ขึ้นอยู่กับการมีปริมาณ ferrous myoglobin ที่เติมลงไป จึงทำให้ค่าที่ได้มีความผันแปรสูง แต่โดยภาพรวมแล้วการเติม ferrous myoglobin ลงไปจะทำให้ระบบมีแนวโน้มของค่า conjugated diene สูงกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 18 และ 19) เมื่อพิจารณาค่า TBARS พบว่า การเพิ่มปริมาณ ferrous myoglobin ลงไปจะทำให้ระบบจำลองมีแนวโน้มของค่า TBARS เพิ่มขึ้น ทั้งในปลาดุก (รูปที่ 20) และปลาโอ (รูปที่ 21) ซึ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ของระบบจำลองทั้งคู่มีแนวโน้มเหมือนกันกล่าวคือ มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงในช่วงหลังของการบ่ม ซึ่งการลดลงของค่า TBARS นั้นอาจเกิดจากการหมดไปของสารตั้งต้นประกอบกับการระเหยไปของแอลดีไฮด์สายสั้นหรือการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อันเนื่องมาจากการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปแล้ว ferrous myoglobin ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM จะมีผลในการเร่งการออกซิเดชันของไขมันสูงสุดทั้งในปลาดุกและปลาโอ ด้วยเหตุนี้จึงทำการคัดเลือกความเข้มข้นของ ferrous myoglobin ดังกล่าวในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงถึงการเก็บรักษาแบบแช่เย็น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และสภาวะเร่งตามลำดับ เป็นเวลา 180 นาที (รูปที่ 22 และ 23) จากการทดลอง พบว่า ค่า conjugated diene ของปลาโอในทุก ๆ อุณหภูมิมีค่าสูงกว่าปลาดุก ($p < 0.05$) และค่า conjugated diene ในปลาโอมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ($p < 0.05$) ส่วนค่า conjugated diene ในปลาดุกในแต่ละอุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 22) แต่เมื่อพิจารณาค่า TBARS กลับพบว่า ค่า TBARS ของปลาดุกมีค่าสูงกว่าปลาโอในทุก ๆ อุณหภูมิ และมีค่าสูงสุดที่ 25 องศาเซลเซียส ($p < 0.05$) (รูปที่ 23) ส่วนค่า TBARS ในปลาโอมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเพิ่มขึ้น จากการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า อัตราการออกซิเดชันของไขมันในปลาที่เร่งด้วย ferrous myoglobin นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและอุณหภูมิ

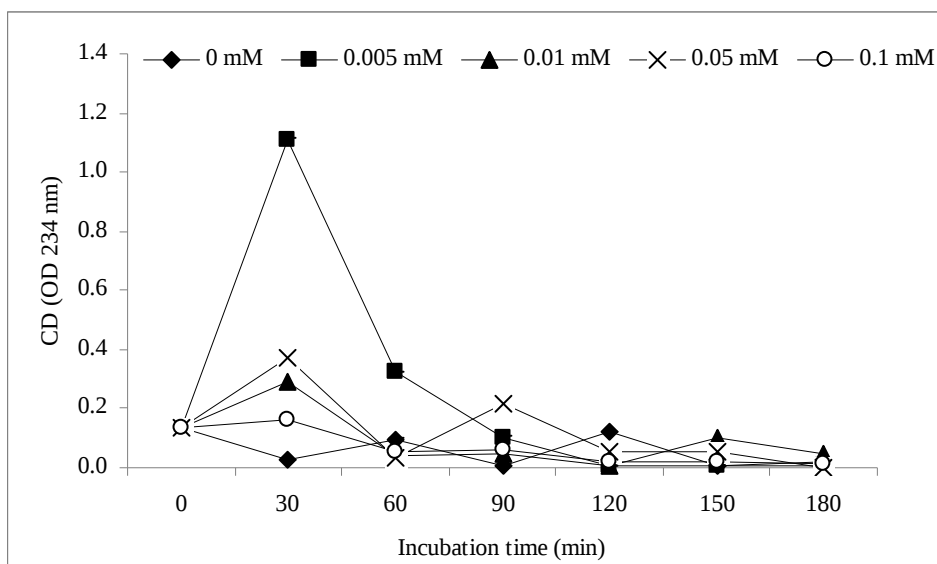


Figure 18 Effect of ferrous myoglobin concentration on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system from catfish.

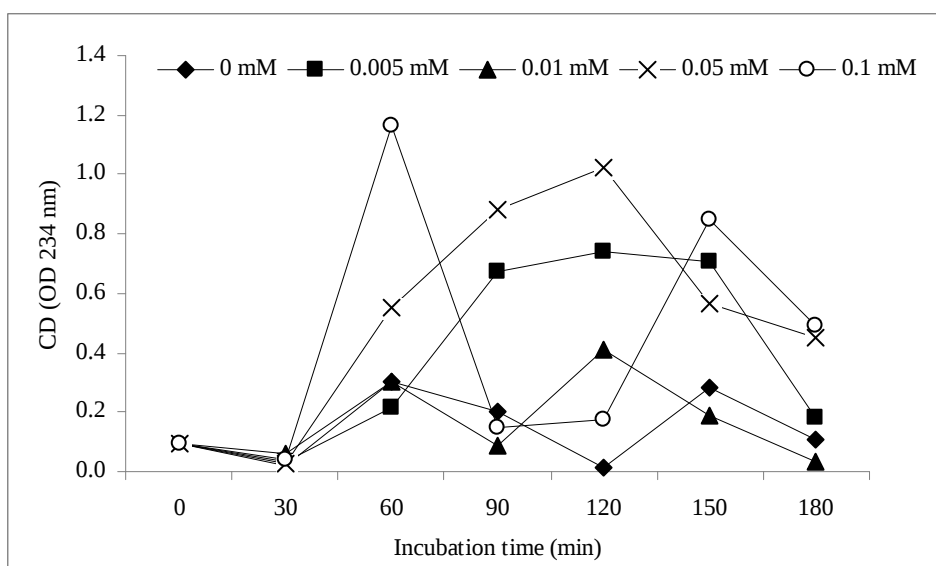


Figure 19 Effect of ferrous myoglobin concentration on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system from Frigate mackerel.

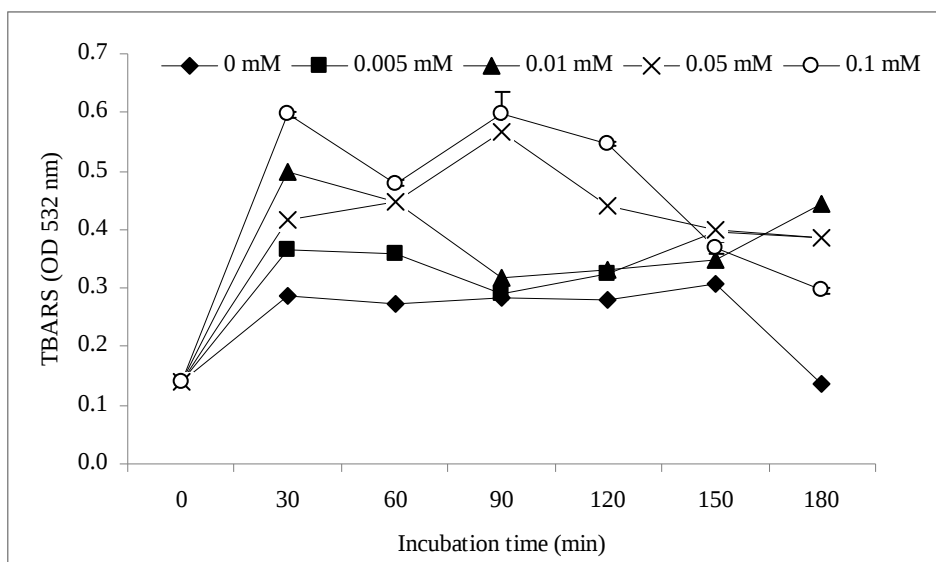


Figure 20 Effect of ferrous myoglobin concentration on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system from catfish.

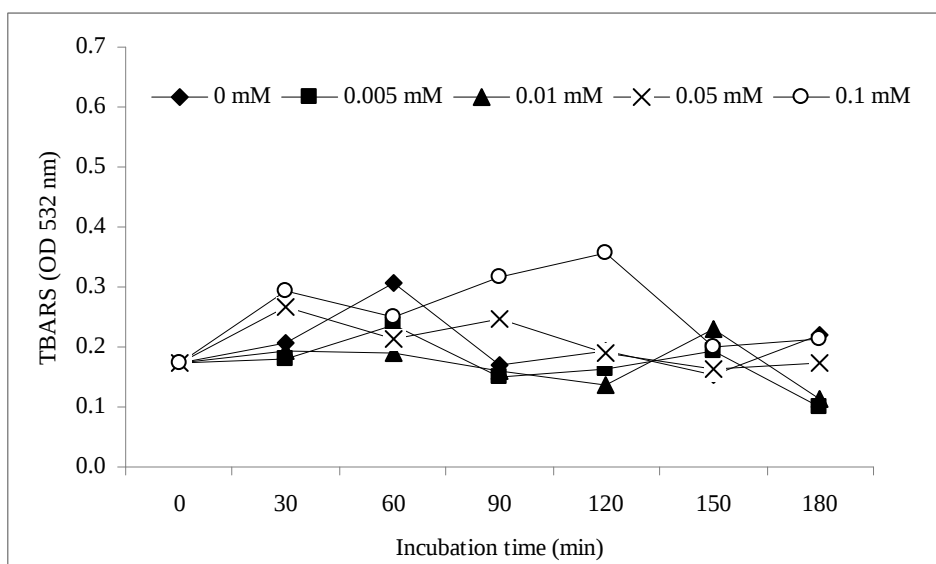


Figure 21 Effect of ferrous myoglobin concentration on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system from Frigate mackerel.

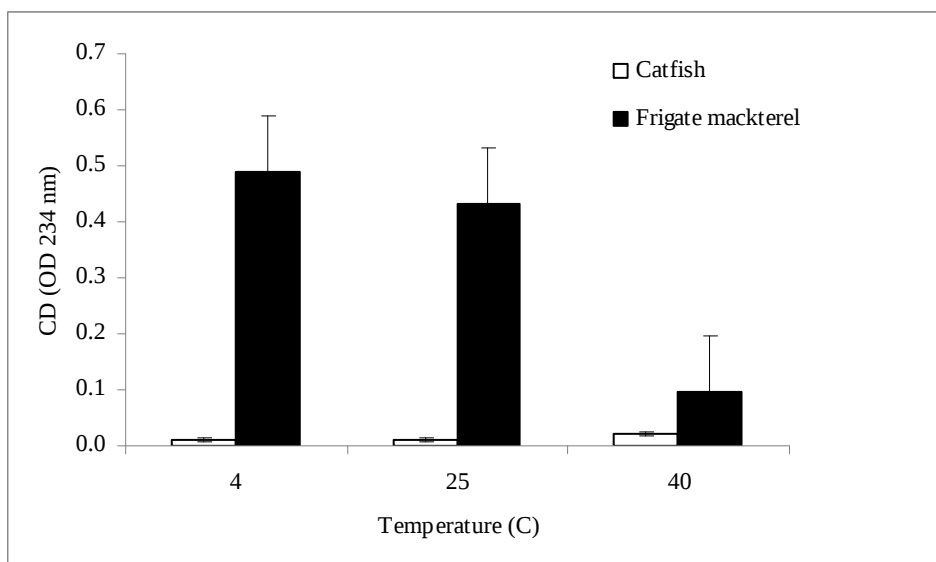


Figure 22 Effect of temperature on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

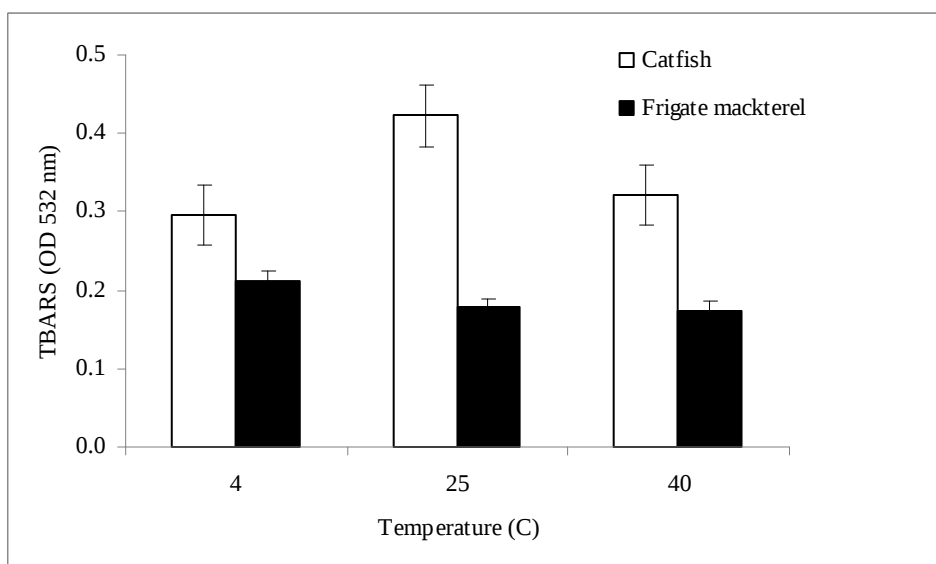


Figure 23 Effect of temperature on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome (ความเข้มข้นของ ferrous myoglobin เท่ากับ 0.1 mM อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที) พบว่าค่า conjugated diene ของปลาโอในทุก ๆ พีเอชมีค่าสูงกว่าปลาดุก ($p < 0.05$) และค่า conjugated diene ในปลาโอและปลาดุกมีค่าสูงที่สุดที่พีเอช 5 และ 8 ตามลำดับ ($p < 0.05$) (รูปที่ 24) แต่เมื่อพิจารณาค่า TBARS กลับพบว่า ค่า TBARS ของปลาดุกมีค่าสูงกว่าปลาโอในทุก ๆ พีเอชและมีค่าสูงสุดที่พีเอช 7 ($p < 0.05$) (รูปที่ 25) จากการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า พีเอชมีอิทธิพลต่ออัตราการออกซิเดชันของไขมันในปลาที่เร่งด้วย ferrous myoglobin ในปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยถ้าพิจารณาเฉพาะค่า TBARS ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงมาจาก conjugated diene นั้นสามารถสรุปได้ว่าการออกซิเดชันของไขมันในปลาโอและปลาดุกมีค่าสูงสุดที่พีเอช 7

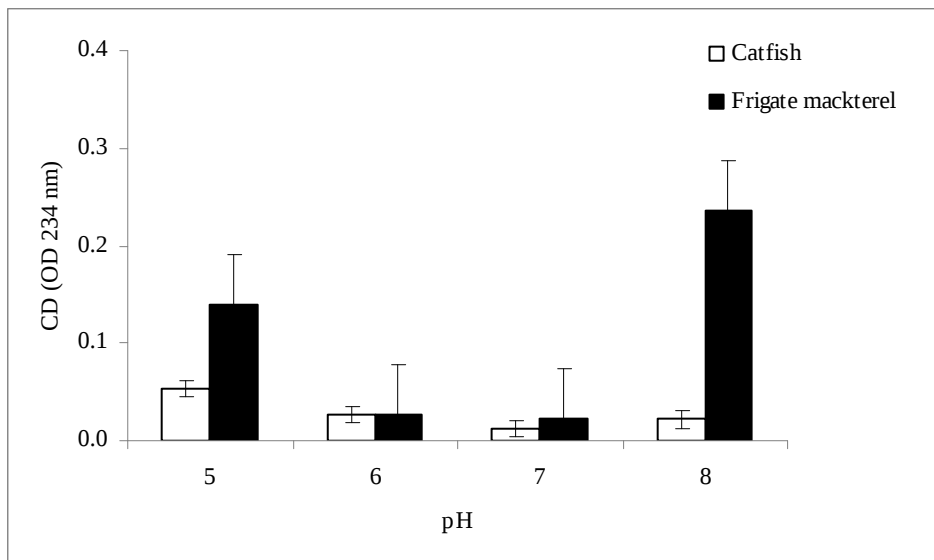


Figure 24 Effect of pH on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

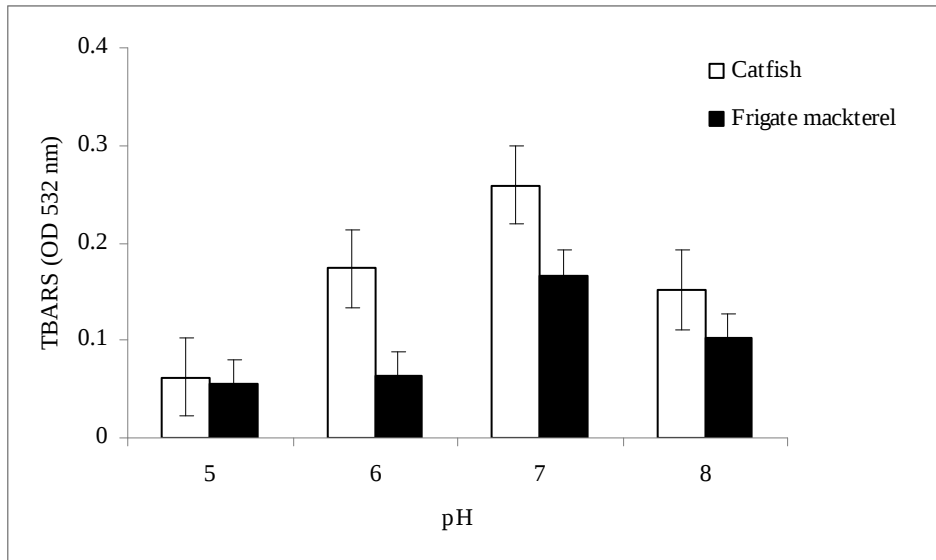


Figure 25 Effect of pH on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

จากการศึกษาผลของเกลือต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome (ความเข้มข้นของ ferrous myoglobin เท่ากับ 0.1 mM พีเอช 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที) โดยเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปร้อยละ 0, 0.25, 2.5 และ 5 ของปริมาตรของระบบจำลอง พบว่า ค่า conjugated diene มีค่าสูงที่สุดในปลาตุ๊กในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 2.5 (รูปที่ 26) ส่วนค่า TBARS นั้นพบว่า ปลาโอมีค่า TBARS สูงกว่าปลาตุ๊กในทุก ๆ ระดับความเข้มข้นของเกลือ (รูปที่ 27) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การเติมเกลือในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้ค่า TBARS มีแนวโน้มลดลงในปลาทั้งสองชนิด ซึ่งการลดลงของค่า TBARS นั้นอาจเกิดขึ้นได้ในสองกรณี กล่าวคือ หากเกลือที่เติมลงไปมีผลในการเร่งออกซิเดชันของไขมันอย่างต่อเนื่องจนทำให้ แอลดีไฮด์เปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์อื่น ๆ จึงทำให้ตรวจวัดค่า TBARS ได้น้อยลง ส่วนในอีกกรณีคือ เกลือดังกล่าวมีผลในการชะลอการออกซิเดชันของไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ขั้นปฐมภูมิไปเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิจึงทำให้ค่า TBARS ลดลง แต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับค่า conjugated diene ด้วยแล้วนั้น การลดลงของค่า TBARS น่าจะสัมพันธ์กับการออกซิเดชันอย่างต่อเนื่องมากกว่าการยับยั้งการออกซิเดชัน เนื่องจากไขมันได้ผ่านการออกซิเดชันมาแล้วในขั้นต้น (conjugated diene มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องของแอลดีไฮด์ที่เปลี่ยนมาจากผลิตภัณฑ์ขั้นปฐมภูมิจึงอาจถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้ง่ายด้วยเกลือที่มีอยู่ จึงทำให้ตรวจวัดค่า TBARS ได้น้อยลง

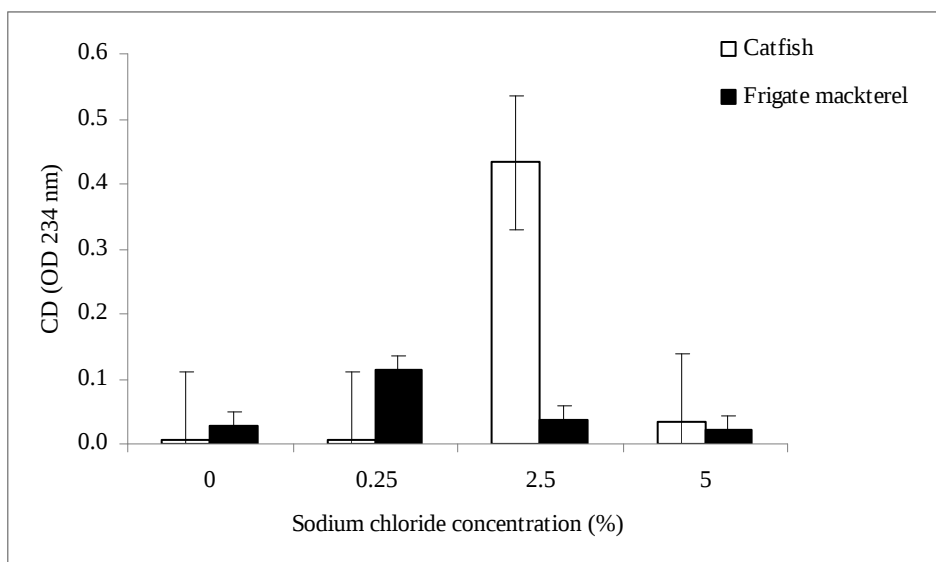


Figure 26 Effect of sodium chloride concentration on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

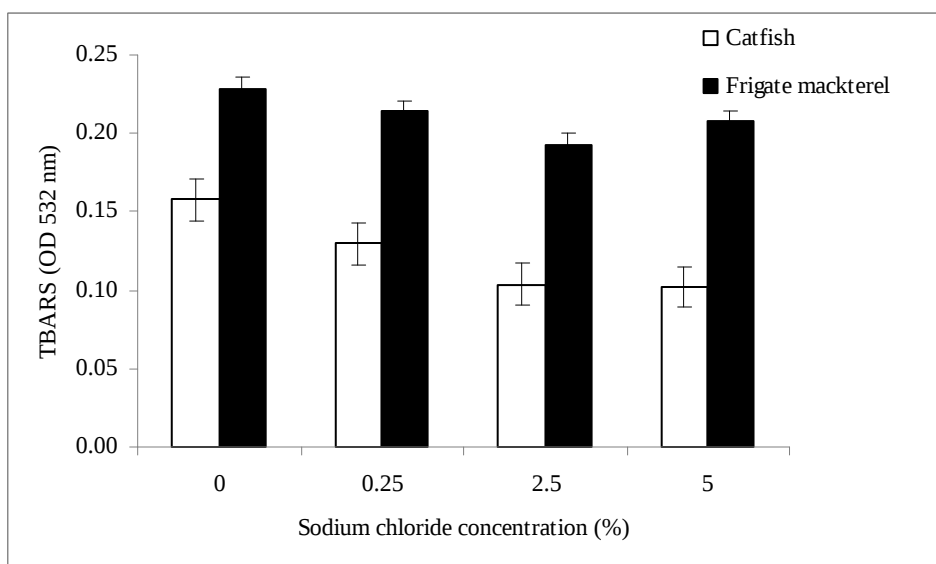


Figure 27 Effect of sodium chloride concentration on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

จากการศึกษาผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome (ความเข้มข้นของ ferrous myoglobin เท่ากับ 0.1 mM พีเอช 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที) โดยเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงไปร้อยละ 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 12.5 และ 25 ของปริมาตรของระบบจำลอง เพื่อจำลอง Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสำคัญที่เร่งการออกซิเดชันของไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบที่มีเหล็ก พบว่าค่า conjugated diene ในปลาทั้งสองชนิดมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน (รูปที่ 28) ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างและการสลายตัวของ conjugated diene สามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง เพราะค่าดังกล่าวจัดเป็นดัชนีบ่งชี้การออกซิเดชันของไขมันขั้นปฐมภูมิซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิได้อย่างสมำเสมอหากมีสภาวะที่เหมาะสม แต่เมื่อพิจารณาค่า TBARS พบว่าค่า TBARS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น และมีความแตกต่างกันระหว่างปลาโอและปลาดุกในทุก ๆ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ศึกษา (รูปที่ 29) จากการทดลองจึงกล่าวได้ว่า การออกซิเดชันของไขมันในระบบที่มี ferrous myoglobin จะถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นสูง ๆ ซึ่งระบบที่มีทั้งเหล็กและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลซึ่งมีความว่องไวต่อการเร่งออกซิเดชันของไขมัน จึงทำให้ไขมันมีอัตราการออกซิเดชันสูง

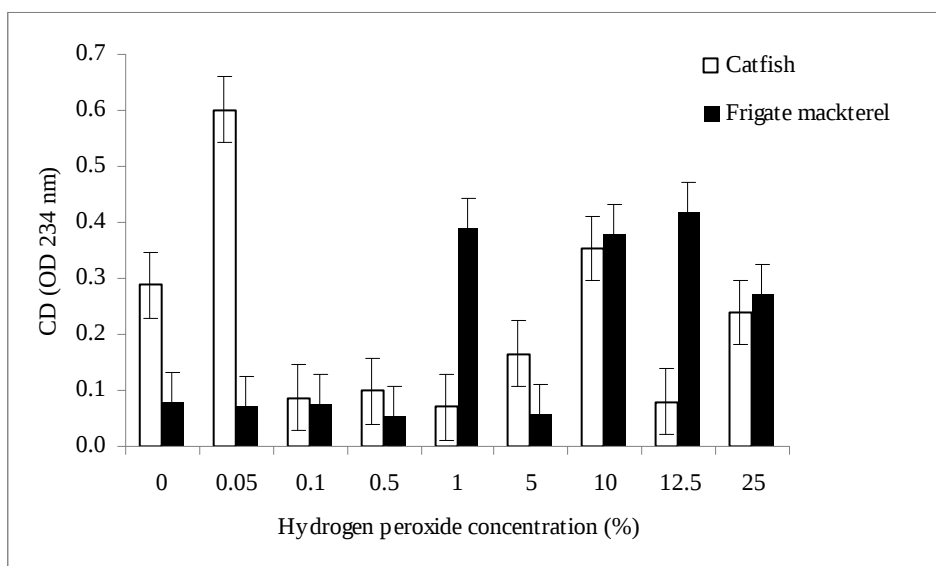


Figure 28 Effect of hydrogen peroxide concentration on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

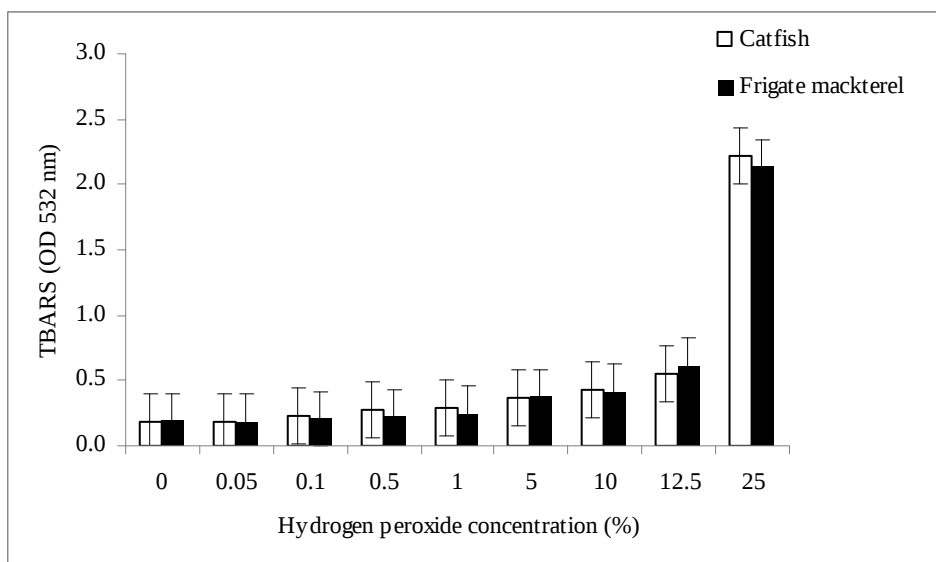


Figure 29 Effect of hydrogen peroxide concentration on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

ศึกษาผลของ EDTA ต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เร่งด้วย ferrous myoglobin โดยเตรียมระบบ lecithin - liposome (ความเข้มข้นของ ferrous myoglobin เท่ากับ 0.1 mM พีเอช 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที) โดยทำการเติม EDTA ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในระบบจำลองเท่ากับ 0, 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของปริมาตรของระบบจำลองพบว่า EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับปลาดุกและ ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับปลาโอทำให้ค่า conjugated diene ลดต่ำกว่าชุดควบคุมได้ดีที่สุด แต่ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่านี้จะทำให้ค่า conjugated diene มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (รูปที่ 30) ซึ่งแสดงว่าความสามารถในการป้องกันการสะสมของ conjugated diene ของ EDTA ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ เมื่อพิจารณาค่า TBARS พบว่าค่า TBARS ในปลาดุกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ EDTA เพิ่มขึ้น แต่ค่า TBARS ดังกล่าวจะมีค่าต่ำกว่าในปลาโอในทุก ๆ ระดับความเข้มข้นของ EDTA เมื่อพิจารณาค่า TBARS ของปลาโอ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA จาก 0.5-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้ค่า TBARS ของปลาโอมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 31) จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันของ EDTA ในระบบจำลองที่เร่งด้วย ferrous myoglobin ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ รวมทั้งชนิดของปลา

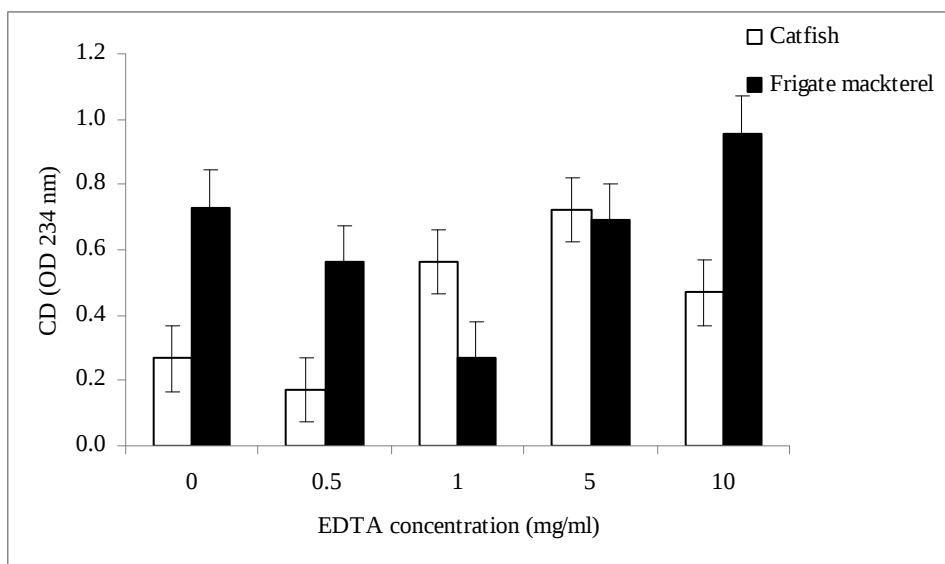


Figure 30 Effect of EDTA concentration on the formation of conjugated diene in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

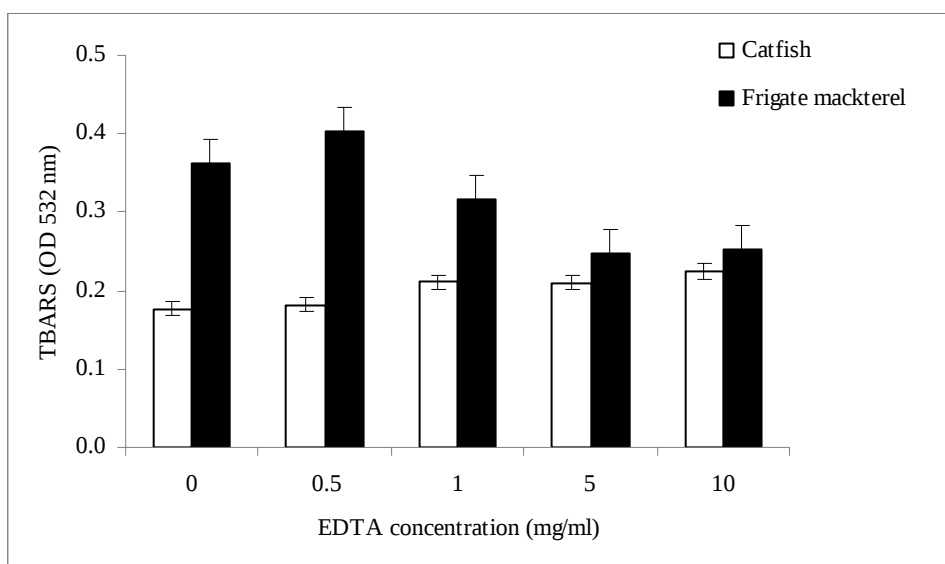


Figure 31 Effect of EDTA concentration on the formation of TBARS in lecithin-liposome model system catalyzed by ferrous myoglobin.

สรุปผลการทดลอง

กล้ามเนื้อปลาดุกและปลาโอมีองค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะของกล้ามเนื้อที่แตกต่างกัน กล้ามเนื้อของปลาดุกกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีฟิสิกส์ที่แตกต่างกันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันจากปลาดุกและปลาโอที่เร่งด้วยไมโอโกลบินจากปลาดุกและปลาโอในระบบจำลอง พบว่า ความเข้มข้นของไมโอโกลบิน อุณหภูมิ ระยะเวลา พีเอช เกลือโซเดียมคลอไรด์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และ EDTA มีบทบาทต่อการออกซิเดชันของไขมัน โดยปัจจัยเหล่านี้จะมีผลในการเร่งการออกซิเดชันของไขมันแตกต่างกันในกล้ามเนื้อปลาดุกและปลาโอ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ สัญญาเลขที่ MRG5380109

เอกสารอ้างอิง

สุทรวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajibas, A. and Puigserver, A. 2001. Effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. J. Food Sci. 66: 926-932.

Andreo, A. I., Doval, M. M., Romero, A. M. and Judis, M. A. 2003. Influence of heating time and oxygen availability on lipid oxidation in meat emulsions. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105: 207-213.

AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C.

Belitz, H. D., Grosch, W. and Schieberla, P. 2004. Meat. In Food Chemistry (Belitz, H. D., Grosch, W. and Schieberla, P. eds.). p. 566-618. Springer. Berlin.

Benjakul, S. and Bauer, F. 2001. Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles. Food Chem. 72: 207-217.

Benjakul, S., Seymour T. S., Morrissey, M. T. and An, H. 1997. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. J. Food Sci. 62: 729-733.

- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37: 911-917.
- Buege, J. A. and Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 52: 302-304.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Faustman, C. 2007. Characterization of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle. *Food Chem.* 100: 156-164.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Faustman, C. 2005. Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chem.* 93: 607-617.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Faustman, C. 2006. Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. *Food Chem.* 99: 83-91.
- Chan, W. K. M., Faustman, C., Yin, M. and Decker, E. A. 1997. Lipid oxidation induced by oxymyoglobin and metmyoglobin with involvement of H₂O₂ and superoxide anion. *Meat Sci.* 46: 181-190.
- Cho, S., Endo, Y., Fujimoto, K. and Kaneda, T. 1989. Oxidative deterioration of lipids in salted and dried sardines during storage at 5°C. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55: 541-544.
- Eder, R. 1996. Pigments. *In Handbook of Food Analysis Vol 1.* (Nollet, L. M. L. ed.). p. 996-1005. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Faustman, C., Yin, M. C. and Nadeau, D. B. 1992. Color stability, lipid stability, and nutrient composition of red and white veal. *J. Food Sci.* 57: 302-304.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C. and Hultin, H. O. 1996. Characteristics of edible muscle tissues. *In Food Chemistry.* (Fennema, O. R., ed.). p. 880-942. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Haard, N. F. 1992. Biochemistry and chemistry of color and color change in seafoods. *In Advance in Seafood Biochemistry.* (Flick, G. J. and Martin, R. E., eds.). p. 312-319. Technomic Publishing Co., Inc. USA.

- Harris, P. and Tall, J. 1994. Rancidity in fish. *In* Rancidity in Foods. (Allen, J. C. and Hamilton, R. J., eds.). p. 257-272. Chapman & Hall. London.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M. and Shiro, K. 1979. Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45: 1435-1441.
- Hasegawa, H. 1987. Laboratory manual on analytical methods and procedures for fish and fish products. Marine Fisheries Research Department. SEAFDEC. Singapore.
- Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee, B. J., Hendricks, D. G. and Cornforth, D. P. 1999. A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system. *Meat Sci.* 51: 245-253.
- Lee, S., Joo, S. T., Alderton, A. L., Hill, D. W. and Faustman, C. 2003. Oxymyoglobin and lipid oxidation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) loins. *J. Food Sci.* 68: 1664-1668.
- Love, J. D. 1983. The role of heme iron in the oxidation of lipids in red meats. *Food Technol.* 12: 117-120.
- Lowry, R. and Tinsley, I. 1976. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53: 470-472.
- McDonald, R. E. and Hultin, H. O. 1987. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeleton muscle. *J. Food Sci.* 52: 15-21, 27.
- Mercier, Y., Gatellier, P. and Renerre, M. 2004. Lipid and protein oxidation *in vitro*, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Sci.* 66: 467-473.
- Millar, S. J., Moss, B. W. and Stevenson, M. H. 1996. Some observations on the absorption spectra of various myoglobin derivatives found in meat. *Meat Sci.* 42: 277-288.
- Nawar, W. W. 1996. Lipids. *In* Food Chemistry. (Fennema, O. R. ed.). p. 225-319. Marcel Dekker, Inc. New York.

- O'Grady, M. N., Monahan, F. J. and Brunton, N. P. 2001. Oxymyoglobin oxidation in bovine muscle-mechanistic studies. *J. Food Sci.* 66: 386-392.
- Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E. and Robles-Burgueno, M. R. 2000. Postmortem biochemical characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *J. Food Sci.* 65: 40-47.
- Renner, M. and Labas, R. 1987. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Sci.* 19: 151-165.
- Richards, M. P. and Li, R. 2004. Effects of released iron, lipid peroxides, and ascorbate in trout hemoglobin-mediated lipid oxidation of washed cod muscle. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4323-4329.
- Shantha, N. C. and Decker, E. A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *JAOAC.* 77: 421-424.
- Stewart, J. C. 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* 104: 10-14.
- Toyomizu, M., Hanaoka, K. and Yamaguchi, K. 1981. Effect of release of free fatty acids by enzymatic hydrolysis of phospholipids on lipid oxidation during storage of fish muscle at -5°C. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47: 605-610.
- Undeland, I. 2001. Lipid oxidation in fatty fish during processing and storage. *In* *Farmed Fish Quality.* (Kestin, S. C. and Warris, P. D., eds.). p. 261-275. Fishing News Books, Blackwell Science.
- Undeland, I., Ekstrand, B. and Lingnert, H. 1998. Lipid oxidation in herring (*Clupea harengus*) light muscle, dark muscle, and Skin, stored separately or as intact fillets. *JAOCS.* 75: 581-590.
- Yin, M. and Faustman, C. 1994. The influence of microsomal and cytosolic components on the oxidation of myoglobin and lipid *in vitro*. *Food Chem.* 51: 159-164.

Output ที่ได้จากโครงการ

- Chaijan, M., Panpipat, W., Benjakul, S., and Riebroy, S. 2012. Characterization of dark and ordinary muscles from Frigate mackerel (*Auxis thazard*). International Conference of Food and Applied Bioscience. 6-7 Feb, Kantary Hill Resort, Chiang Mai, Thailand.
- Chaijan, M., Klomklao, S. and Benjakul, S. 2012. Characterization of muscles from Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*). Food Chemistry. Submitted.

ภาคผนวก

P-11

Characterization of Dark and Ordinary Muscles from Frigate Mackerel (*Auxis thazard*)

Manat Chaijan^{1*}, Worawan Panpipat¹, Soottawat Benjakul², Sappasith Klomklao³ and Siriporn Riebroy⁴

¹Division of Agro-Industry, School of Agricultural Technology, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand

²Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand

³Department of Food Science and Technology, Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University, Phattalung Campus, Phattalung 93110, Thailand

⁴Food and Nutrition Program, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author E-mail: cmanat@wu.ac.th

Chemical compositions and color of dark and ordinary muscles from frigate mackerel (*Auxis thazard*) were characterized. Moisture was the most predominant component found in both muscle types and the higher content was found in ordinary muscle ($p < 0.05$). Ash and lipid contents were found to be higher in dark muscle ($p < 0.05$). No difference in protein was observed between two muscle types ($p > 0.05$). Ordinary muscle composed of a higher content of non-protein nitrogen ($p < 0.05$). Sarcoplasmic and stromal proteins of dark muscle were higher than ordinary muscle ($p < 0.05$). Both muscles had the comparable contents of myofibrillar protein, alkaline-soluble protein and sodium chloride ($p > 0.05$). Dark muscle composed of greater contents of myoglobin, carotenoid and minerals (iron, copper and selenium) whereas the content of phospholipid was higher in ordinary muscle ($p < 0.05$). SDS-PAGE revealed that myofibrillar proteins were major proteins found in both muscle types. Myosin heavy chain (MHC) and actin were predominant proteins in myofibrillar fraction and MHC was generally higher in ordinary muscle than in dark muscle. Dark muscle had lower values of L^* and b^* but it had higher a^* value and redness index ($p < 0.05$). Lipid extracted from dark muscle was more susceptible to oxidation than that from ordinary muscle as indicated by a shorter induction time analyzed by Rancimat test ($p < 0.05$).

Keywords: Muscle, Frigate mackerel, Composition, Color

Manuscript Number:

Title: Characterization of muscles from frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*)

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: characterization; muscle; Frigate mackerel; catfish

Corresponding Author: Dr Manat Chaijan, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Walailak University

First Author: Manat Chaijan, Ph.D.

Order of Authors: Manat Chaijan, Ph.D.; Sappasith Klomklao, Ph.D.; Soottawat Benjakul, Ph.D.

Abstract: Dark and ordinary muscle from Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) were characterized. Chemical and physical compositions were different among species as well as muscle types. Moisture was the most predominant component found in both muscle types of both species and the higher content was found in ordinary muscle ($p < 0.05$). Catfish, particularly ordinary muscle, composed of higher contents of lipid and carotenoid than Frigate mackerel muscle ($p < 0.05$) but ordinary muscle from Frigate mackerel had the highest phospholipid content ($p < 0.05$). Dark muscle from both species composed of a greater ash content than ordinary muscle ($p < 0.05$). Frigate mackerel muscle contained a greater content of protein compared with catfish muscle ($p < 0.05$). Myofibrillar proteins were major proteins found in both muscle types. Both dark and ordinary muscles of Frigate mackerel contained greater contents of myofibrillar proteins than catfish muscle ($p < 0.05$). Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed that myosin heavy chain and actin were predominant proteins found in both muscle types of both species but the intensities of those protein bands were higher in catfish muscles suggesting a higher integrity of myosin and actin from catfish. Dark muscle from Frigate mackerel composed of the highest sarcoplasmic proteins, especially extractable myoglobin ($p < 0.05$). Both dark and ordinary muscles from Frigate mackerel contained a greater content of sodium chloride compared with those from catfish ($p < 0.05$). The highest contents of iron, copper and selenium were found in Frigate mackerel dark muscle ($p < 0.05$). The pH of ordinary muscle from both species was higher than dark muscle ($p < 0.05$). Frigate mackerel, especially dark muscle, exhibited the most dark-red color as shown by the lowest L^* and b^* values with the highest a^* value and redness index (a^*/b^*) ($p < 0.05$).

WALAILAK UNIVERSITY
Thasala, Nakhon Si Thammarat
80160, Thailand

August 14, 2012

Professor Gordon Birch
Managing Editor, Food Chemistry
School of Food Biosciences
University of Reading
Whiteknights, PO Box 226
Reading RG6 6AP, UK

Dear Professor Gordon Birch,

I would like to submit a revised manuscript entitled “Characterization of muscles from frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*)” written by M. Chaijan, S. Klomklao and S. Benjakul to be published in Food Chemistry. This manuscript has not been published elsewhere and also it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere. Attached files are Microsoft PDF of manuscript’s text, tables and figure. If you have any questions, please do not hesitate to let me know.

Sincerely yours,
Manat Chaijan, Ph.D.
Assistant Professor, Department of Food Technology
cmanat@wu.ac.th

Research highlights

- Dark and ordinary muscle from Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) were characterized.
- The compositions of dark and ordinary muscles from Frigate mackerel and catfish were different in the way which species-dependent.
- The muscle type or muscle location can also influence the characteristics of fish muscle.

**Characterization of muscles from frigate mackerel (*Auxis thazard*)
and catfish (*Clarias macrocephalus*)**

To be submitted to Food Chemistry

Manat Chaijan^{1*}, Sappasith Klomklao² and Soottawat Benjakul³

¹Department of Food Technology, School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80160, Thailand.

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University, Phattalung Campus, Phattalung, 93110, Thailand.

³Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

To whom correspondence should be addressed. Tel: (66) 7567-2384
Fax: (66) 7567-2302, e-mail: cmanat@wu.ac.th

1 **Abstract**

2 Dark and ordinary muscle from Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish
3 (*Clarias macrocephalus*) were characterized. Chemical and physical compositions
4 were different among species as well as muscle types. Moisture was the most
5 predominant component found in both muscle types of both species and the higher
6 content was found in ordinary muscle ($p<0.05$). Catfish, particularly ordinary muscle,
7 composed of higher contents of lipid and carotenoid than Frigate mackerel muscle
8 ($p<0.05$) but ordinary muscle from Frigate mackerel had the highest phospholipid
9 content ($p<0.05$). Dark muscle from both species composed of a greater ash content
10 than ordinary muscle ($p<0.05$). Frigate mackerel muscle contained a greater content
11 of protein compared with catfish muscle ($p<0.05$). Myofibrillar proteins were major
12 proteins found in both muscle types. Both dark and ordinary muscles of Frigate
13 mackerel contained greater contents of myofibrillar proteins than catfish muscle
14 ($p<0.05$). Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed that
15 myosin heavy chain and actin were predominant proteins found in both muscle types
16 of both species but the intensities of those protein bands were higher in catfish
17 muscles suggesting a higher integrity of myosin and actin from catfish. Dark muscle
18 from Frigate mackerel composed of the highest sarcoplasmic proteins, especially
19 extractable myoglobin ($p<0.05$). Both dark and ordinary muscles from Frigate
20 mackerel contained a greater content of sodium chloride compared with those from
21 catfish ($p<0.05$). The highest contents of iron, copper and selenium were found in
22 Frigate mackerel dark muscle ($p<0.05$). The pH of ordinary muscle from both species
23 was higher than dark muscle ($p<0.05$). Frigate mackerel, especially dark muscle,
24 exhibited the most dark-red color as shown by the lowest L^* and b^* values with the
25 highest a^* value and redness index (a^*/b^*) ($p<0.05$).

Keywords: characterization; muscle; Frigate mackerel; catfish

Introduction

Surimi can theoretically produce from any fish (Shimizu, Toyohara & Lanier, 1992) but the rheological characteristics of the surimi gel depend on the properties of myofibrillar proteins, which are affected by the species (Shimizu *et al.*, 1992; Niwa, 1992; Chaijan, Panpipat & Benjakul, 2010). The marine white fish species used in Southeast Asia for production of surimi are mainly threadfin bream (*Nemipterus* spp.), bigeye snapper (*Priacanthus* spp.), croaker (*Pennahia* and *Johnius* spp.) and lizardfish (*Saurida* spp.) (Morrissey & Tan, 2000). However, the major problem facing the Thai surimi industry is the supply of raw materials (Morrissey & Tan, 2000). Due to the limited marine white muscle fish resources with the overexploitation of marine white fish in the Gulf of Thailand, dark muscle fish have been paid more attention as a potential alternative raw material for surimi production (Morrissey & Tan, 2000). Hultin & Kelleher (2000) reported that dark-fleshed fish species make up 40-50% of the total fish catch in the world. In 2006, the catch of pelagic fish in the Gulf of Thailand was approximately 844.2 metric tons (Department of Fisheries, 2006). Among all dark-fleshed fish species, mackerel, such as Frigate mackerel, short-bodied mackerel and Indian mackerel, was one of the most abundant species caught in Southern Thailand (Chaijan *et al.*, 2010). Beside marine dark-fleshed fish, freshwater fish such as catfish and tilapia can be used for production of surimi, instead of marine white-fleshed fish, as well (Rawdkuen, Sai-Ut, Khansorn, Chaijan & Benjakul, 2009). Catfish is one of the important economic freshwater fish of Thailand. Traditionally, catfish has been used almost exclusively for fresh consumption and some part is introduced to fillet industry. Due to the high current volume of production, it could be

1 used by the industry to develop other process products particularly for surimi
2 production. As a consequence, the use of the dark-fleshed fish and freshwater fish for
3 surimi production is one of a major challenge ways to overcome such overexploitation
4 of marine white fish in the Gulf of Thailand problems. However, the characteristics of
5 surimi gel are species-dependent which was correlated with the muscle compositions
6 (Niwa, 1992). So far, Frigate mackerel and catfish have been used for surimi
7 production even to a small portion in Thailand. However, no information regarding
8 compositions of muscles from both species caught in Thailand has been reported.
9 Therefore, this study aimed to characterise the chemical compositions of Frigate
10 mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles.

11

12 **Materials and methods**

13 **Chemicals**

14 Sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiothreitol (DTT), β -mercaptoethanol
15 (β ME) were purchased from Sigma (St. Louise, MO, USA). Trichloroacetic acid was
16 obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dithionite was purchased from
17 Riedel (Seeize, Germany). Chloroform was purchased from BDH (Poole, England).
18 Disodium hydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate were purchased
19 from Fluka (Buchs, Switzerland). All chemicals were of analytical grade.

20 **Fish samples**

21 Frigate mackerel (*Auxis thazard*) with an average weight of 95-110 g was
22 caught from Thasala-Nakhon Si Thammarat Coast along the Gulf of Thailand. The
23 fish, off-loaded approximately 12 h after capture, were placed in ice with a fish/ice
24 ratio of 1:2 (w/w) and transported to the School of Agricultural Technology, Walailak
25 University, Thasala, Nakhon Si Thammarat, Thailand within 15 min. The fish were

1 immediately washed, filleted and manually excised into ordinary and dark muscles.
2 Catfish (*Clarias macrocephalus*) with an average weight of 250-300 g were obtained
3 from Thasala market, Nakhon Si Thammarat, and transported alive to the School of
4 Agricultural Technology, Walailak University within 15 min. Upon arrival, catfish
5 were exsanguinated and kept refrigeration for 12 h to balance the post-mortem period
6 with the Frigate mackerel. Thereafter, the catfish muscles were excised following the
7 procedure used for Frigate mackerel. The muscles were kept on ice during preparation
8 and analysis.

9 **Proximate analysis**

10 Protein, ash, fat and moisture contents of muscle from fish raw materials were
11 determined according to the methods of AOAC (2000).

12 **Electrophoresis**

13 Protein patterns of dark and ordinary muscles from Frigate mackerel and
14 catfish were analyzed on SDS-PAGE under reducing condition according to the
15 method of Laemmli (1970). To prepare the protein sample, 27 ml of 5% (w/v) SDS
16 solution were added to the sample (3 g). The mixture was homogenized for 1 min.
17 The homogenate was incubated at 85°C for 1 h to dissolve total proteins. The sample
18 was centrifuged at 8,500×g for 5 min at room temperature (26-28°C) using a Biofuge
19 primo centrifuge (Sorvall, Hanau, Germany). Protein concentration was determined
20 according to the Biuret method (Robinson & Hodgen, 1940), using bovine serum
21 albumin as a standard. Protein samples were applied into the gel. After separation, the
22 proteins were stained in 0.125% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 and destained
23 in 25% (v/v) ethanol and 10% (v/v) acetic acid.

24

25

Muscle fractionation

The muscles were subjected to fractionation according to the method of Hashimoto, Watabe, Kono & Shiro (1979). The muscle (20 g) was homogenised in 200 ml of phosphate buffer (15.6 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄), pH 7.5 using an IKA Labortechnik homogeniser (Selangor, Malaysia). The homogenate was centrifuged at 5,000×g for 15 min at 4°C using a Sorvall Model RC-B Plus centrifuge (Newtown, CT, USA). The residue was added with 200 ml of the same buffer, homogenised and centrifuged again. These two supernatants were combined and trichloroacetic acid was added to obtain a final concentration of 5%. The resulting precipitate was collected by filtration and referred to as “sarcoplasmic protein fraction”. The filtrate was used as non-protein nitrogenous compound fraction. For above residue, 10 volumes of phosphate buffer (15.6 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄) containing 0.45 M KCl, pH 7.5 were added. The mixtures were homogenised and centrifuged at 5,000×g for 15 min at 4°C. The process was repeated twice. Both supernatants were combined and used as myofibrillar protein fraction. The pellet obtained was mixed with 5 volumes of 0.1 N NaOH and stirred for 12 h at 4°C. The mixtures were then centrifuged at 5,000×g for 15 min at 4°C. The supernatant was used as alkali-soluble protein fraction. The final residue was used as stroma fraction. Each fraction was subjected to nitrogen analysis using Kjeldahl method (AOAC, 2000).

Myoglobin content determination

The myoglobin content of fish muscle was determined by direct spectrophotometric measurement, as described by Chaijan, Benjakul, Visessanguan & Faustman (2004). Two grams of mince were weighed into a 50 ml centrifuge tube and 20 ml of 40 mM phosphate buffer, pH 6.8, were added. The mixture was

1 homogenised at 20,000 rpm for 10 s, followed by centrifuging at 3000×g for 30 min at
2 4°C. The supernatant was filtered with a Whatman No.1 filter paper. The supernatant
3 was treated with 0.2 ml of 1% (w/v) sodium dithionite to reduce the myoglobin and
4 then absorbance measured at 525 nm. Myoglobin content was calculated from the
5 millimolar extinction coefficient of 7.6 and a molecular weight of 16,111. Myoglobin
6 content was expressed as mg/g sample.

7 **Salt determination**

8 Salt content in samples was measured by the method of AOAC (2000).
9 Sample (1 g) was treated with 10 ml of 0.1 N AgNO₃ and 10 ml of HNO₃. The
10 mixture was boiled gently on a hot plate until all solids except AgCl₂ were dissolved
11 (usually 10 min). The mixture was then cooled using running water; 50 ml of distilled
12 water and 5 ml of ferric alum indicator were added. The mixture was titrated with
13 standardized 0.1 N KSCN until the solution became permanent brownish-red. The salt
14 content was then calculated and expressed as % NaCl.

15 **pH determination**

16 The pH of fish muscle was measured as described by Benjakul, Seymour,
17 Morrissey & An (1997). Fish muscle was homogenised using an IKA Labortechnik
18 homogeniser (Selangor, Malaysia) with 10 volumes of deionised water (w/v), and the
19 pH was measured using a pH meter (Cyberscan 500, Singapore) at 25°C.

20 **Lipid extraction**

21 Lipid was extracted by the method of Bligh & Dyer (1959). Sample (25 g) was
22 homogenised with 200 ml of a chloroform:methanol:distilled water mixture
23 (50:100:50) at the speed of 9,500 rpm for 2 min at 4°C using an IKA Labortechnik
24 homogeniser (Selangor, Malaysia). The homogenate was treated with 50 ml of
25 chloroform and homogenised at 9,500 rpm for 1 min. Then, 25 ml of distilled water

1 were added and homogenised again for 30 sec. The homogenate was centrifuged at
2 3,000×g at 4°C for 15 min using a RC-5B plus centrifuge (Sorvall, Norwalk, CT,
3 USA), and transferred into a separating flask. The chloroform phase was drained off
4 into the 125 ml Erlenmeyer flask containing about 2-5 g of anhydrous sodium sulfate,
5 shaken very well, and decanted into a round-bottom flask through a Whatman No.4
6 filter paper. The solvent was evaporated at 25°C using an EYELA rotary evaporator
7 N-100 (Tokyo, Japan), and the residual solvent was removed by flushing nitrogen.

8 **Determination of phospholipid content**

9 Phospholipid content was determined based on the direct spectrophotometric
10 measurement of complex formation between phospholipids and ammonium
11 ferrothiocyanate as described by Stewart (1980). Lipids were extracted from the
12 sample by the method of Bligh & Dyer (1959). Thereafter, lipids (20 ml) were
13 dissolved in chloroform to a final volume of 2 ml. One ml of thiocyanate reagent (a
14 mixture of 0.10 M ferric chloridehexahydrate and 0.40 M ammoniumthiocyanate) was
15 added. After thorough mixing for 1 min, the lower layer was removed and the
16 absorbance at 488 nm was measured. A standard curve was prepared with
17 phosphatidylcholine (0-0.1 mg/ml). The phospholipids content was expressed as
18 mg/100 g lipid.

19 **Total carotenoid determination**

20 The total carotenoids were extracted using the method of Yanar, Celik &
21 Yanar (2004). Homogenised samples of 0.2-0.45 g were added 8 ml acetone and
22 shaken at 200 rpm/min for 1 h in the dark at room temperature of 25°C. The
23 extraction was centrifuged at 5,000 rpm for 5 min and the absorbance at 480 nm was
24 measured. Total carotenoid content was calculated from the millimolar extinction

1 coefficient E(1%,1cm) of 1.900. Total carotenoid content was expressed as mg/g
2 sample.

3 **Determination of minerals**

4 Iron (Fe), copper (Cu) and selenium (Se) contents were determined by an
5 inductively coupled plasma optical emission spectrophotometer (ICP-OES) (Perkin-
6 Elmer, Model 4300 DV, Norwalk, CT) according to the AOAC (2000) method.

7 **Determination of colour and redness index**

8 Colourimetric values of the chopped fish sample were obtained in triplicate by
9 using a portable Hunterlab Miniscan/EX instrument (10° standard observers,
10 illuminant D65, Hunter Assoc. Laboratory; VA, USA). The instrument was calibrated
11 to a white and black standard. The tristimulus L^* (lightness), a^* (redness/greenness),
12 and b^* (yellowness/blueness) measurement mode was used as it relates to the human
13 eye response to colour. The redness index (a^*/b^*) of salted fish was calculated as
14 described by Chen, Chiu & Huang (1997).

15 **Statistical analysis**

16 Data were subjected to analysis of variance (ANOVA). Comparison of means
17 was carried out by Duncan's multiple range test (Steel & Torrie, 1980). Statistical
18 analysis was performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS 11.0
19 for windows, SPSS Inc., Chicago, IL).

20

21 **Results and discussion**

22 **Proximate compositions in Frigate mackerel and catfish muscles**

23 Dark and ordinary muscles from Frigate mackerel and catfish were different in
24 proximate composition (Table 1). The dark muscle is normally concentrated along the
25 lateral line of the body and may represent 15-30% of the total muscle in migratory

fish such as mackerel and 2-12% of less active fish (Haard, 1992). Both muscles from both species composed of moisture as a major component (71.55-75.68%). As a major constituent in fish muscle, protein accounted for approximately 18.19-23.21%. Both dark and ordinary muscles of Frigate mackerel had higher protein contents than those of catfish ($p < 0.05$). Sikorski (1994) and Spinelli & Dassow (1982) reported that crude protein content in the muscle was usually in the broad range of 11-24% (wet weight), depending on the species and variety, the state of nutrition, and the reproductive cycle of the animals, as well as the parts of the organisms. Lipid content was generally higher in catfish muscle, especially ordinary muscle. Catfish ordinary muscle contained approximately 10 times greater lipid content than Frigate mackerel ordinary muscle. For dark muscle, catfish contained about 2.6 times higher lipid content than Frigate mackerel. The lipid content in Frigate mackerel was followed the rule that dark muscles were especially rich in chromoproteins and contained about two to five times more lipids than the ordinary muscles (Sikorsk, Kolakowska & Burt, 1990) but not absolutely true for catfish in which the ordinary muscle contain much more lipids than dark muscle. This was probably due to the fact that catfish was a farm-raised fish in which the chemical compositions of the muscle was governed by feeding as well as the nutrition of the feed. Ash contents of both species were found in the ranges of 1.08-1.21.

Protein patterns and nitrogenous constituents in Frigate mackerel and catfish muscles

Electrophoretic patterns indicated that Frigate mackerel and catfish muscles consisted of several protein bands corresponding to myosin heavy chain (MHC), actin, troponin and tropomyosin. MHC and actin was major proteins in both species but the intensities of those protein bands were higher in catfish muscles suggesting a

1 higher integrity of myosin and actin from catfish (Figure 1). The result was in
2 agreement with Hashimoto *et al.* (1979) who found that MHC showed the highest
3 band intensity in the protein from sardine (*Sardinops melanosticta*) and mackerel
4 (*Pneumatophorus japonicus japonicus*) muscle. Similar results were found in muscle
5 from two species of bigeye snapper (Benjakul, Visessanguan & Leelapongwattana,
6 2002). From the result, Frigate mackerel muscles contained greater content of protein
7 bands, with molecular weight lower than 45 kDa, compared with catfish muscles.
8 These low molecular proteins may categorise into sarcoplasmic protein fractions
9 which normally found in dark-fleshed fish with a greater extent. Naturally, dark
10 fleshed-fish species contained the high content of dark muscle comprising a
11 considerable amount of sarcoplasmic proteins (Sikorski *et al.*, 1990; Spinelli &
12 Dassow, 1982).

13 Proteins in dark and ordinary muscles from both species were classified into
14 five fractions based on solubility (Table 2). Myofibrillar proteins were found as major
15 protein components for both muscle types and species (21.9-30.8 mg/g). Myofibrillar
16 proteins were the dominant proteins, which are involved in muscle contraction
17 (Sikorski, 1994). For the same type of muscle, Frigate mackerel contained a greater
18 amount of sarcoplasmic proteins. However, dark muscle consisted of a greater content
19 of sarcoplasmic protein, compared to ordinary muscle. Haard, Simpson & Pan (1994)
20 suggested that the sarcoplasmic proteins from fish included myoglobin, enzymes and
21 other albumins. The content of sarcoplasmic protein was generally high in pelagic
22 fish, such as sardine and mackerel (Haard *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1979). For
23 both species, dark muscles had a larger amount of stromal protein than ordinary
24 muscle. Greater stroma content in dark muscle could be related to the high mechanical
25 strength of this muscle (Hultin & Kelleher, 2000). Among all muscle types and

1 species, catfish ordinary muscle composed of the highest alkaline-soluble protein
2 content indicating the highest accumulation of denatured proteins in this muscle.
3 Chaijan *et al.* (2004) reported that denatured myofibrillar and sarcoplasmic proteins
4 can be solubilised in alkaline solution. Thus, it was classified as alkaline-soluble
5 protein fraction. Frigate mackerel muscle, particularly ordinary muscle, was
6 composed of a higher content of non-protein nitrogenous compounds than catfish
7 muscle. This might be due to a higher content of amino acids, dipeptide, nucleotide,
8 trimethylamine, urea, and the products of postmortem changes in this species
9 (Foegeding, Lanier & Hultin, 1996; Sikorski, 1994). For the same species, ordinary
10 muscle tended to contain lower amount of non-protein nitrogenous compounds than
11 dark muscle.

12 **Pigments and certain chemical compositions in Frigate mackerel and catfish**
13 **muscles**

14 Different extractable myoglobin content was observed between different
15 muscle types and species (Table 3). Frigate mackerel muscle contained a larger
16 amount of extractable myoglobin, especially in dark muscle, when compared to
17 catfish muscle. The results were in agreement with Spinelli & Dassow (1982) and
18 Hashimoto *et al.* (1979) who reported that myoglobin was dominant in dark muscle.
19 Dark muscle, both superficial and deep-seated, contained more hemoglobin,
20 myoglobin and cytochrome *c* than the ordinary muscles (Sikorski *et al.*, 1990).
21 Muscle of yellowfin tuna contained myoglobin ranging from 37 to 128 mg/100 g in
22 light muscle and 530 to 2,440 mg/100 g in dark muscle (Brown, 1961). Frigate
23 mackerel dark muscle comprised myoglobin 2.5 times greater than catfish dark
24 muscle. For ordinary muscle, Frigate mackerel contained myoglobin 8.2 times higher
25 than catfish. Myoglobin contributed to the redness of muscle, which is associated with

1 the lowered whiteness of surimi gel (Chaijan, Benjakul, Visessanguan, Lee &
2 Faustman, 2007). For the total carotenoid content, it was found that dark and ordinary
3 muscles of catfish contained total carotenoid 12.6 and 33.6 times greater than Frigate
4 mackerel, respectively. Higher content of total carotenoid in catfish muscle, especially
5 ordinary muscle, may correlate with the higher oxidative stability of that muscle
6 because carotenoid can be functioned as antioxidant. Lipid from ordinary muscle of
7 Frigate mackerel contained the highest content of phospholipids and Frigate mackerel
8 had a greater content of phospholipids than catfish ($p<0.05$). The higher phospholipid
9 content in Frigate mackerel muscle may relate to the greater emulsifying ability of this
10 muscle. However, the oxidative stability of this muscle might be limited. Due to a
11 high content of phospholipids which normally contain a high amount of
12 polyunsaturated fatty acids, possibly from the subdermal fat layer, oxidation could
13 take place rapidly (Ke, Ackman, Linke, & Nash, 1977). Considering the sodium
14 chloride content, both ordinary and dark muscles from Frigate mackerel, a marine
15 fish, contained more sodium chloride content than catfish, a freshwater fish ($p<0.05$).
16 This difference was probably due to the different in fishing ground, feeding of the
17 fish, and mineral content in the habitat environment (Chaijan, 2011). The highest
18 contents of prooxidant metals including iron and copper were observed in Frigate
19 mackerel dark muscle ($p<0.05$). The higher the metals the greater the lipid oxidation
20 can be taken place in this muscle. However, Frigate mackerel dark muscle also
21 contained the highest content of selenium, correlating with the highest antioxidative
22 enzyme, glutathione peroxidase, in this muscle. The selenium is found in the active
23 site of glutathione peroxidase and its content was reported to be correlated well with
24 the content of glutathione peroxidase in the muscle (Undeland, Ekstrand & Lingnert,
25 1998).

The post-mortem pHs of Frigate mackerel and catfish muscles were found in the ranges of 5.96-6.86 depending on species and muscle types. Foegeding *et al.* (1996) reported that the ultimate pH of fish muscle was generally in the range of 6.2-6.6. The pH of fish muscle depended on a variety of factors such as species, fishing ground, feeding of the fish, storage temperature and buffering capacity of meat (Pacheco-Aguilar, Lugo-Sanchez & Robles-Burgueno, 2000). Dark muscle of both species had lower pH than ordinary muscle. The activity of enzymes converting glycogen into lactic acid might be different between two muscles. Lactic acid, generated in anoxic conditions from glycogen, is the principal factor in lowering the post-mortem pH in the fish muscles (Sikorski *et al.*, 1990). Dark muscle might contain relatively sufficient in the enzymes which convert glycogen into lactic acid. These features can cause the post-mortem pH to be lower than that of ordinary muscle.

Colour of Frigate mackerel and catfish muscles

Instrumental colour values of Frigate mackerel and catfish muscles are shown in Table 4. From the result, the lightness (L^*) of catfish muscle was higher than Frigate mackerel and the greater L^* value was found in ordinary muscle from both species ($p<0.05$). The redness-greenness (a^*) and redness index (a^*/b^*) of dark muscle was higher than ordinary muscle in both species and the higher a^* value and redness index were noticeable in Frigate mackerel muscle ($p<0.05$). This was in agreement with the greater amount of myoglobin in Frigate mackerel muscle (Table 3). For yellowness-blueness (b^*), ordinary muscle from both species exhibited a higher b^* value ($p<0.05$) and the higher value was observed in catfish muscle. The more yellow of catfish muscle was in accordance with the higher carotenoid content

of that muscle (Table 3). Overall, the color of Frigate mackerel especially dark muscle was more dark-red than catfish muscle.

Conclusion

The characteristics and compositions of dark and ordinary muscles from Frigate mackerel and catfish were different. The compositions and color of fish muscle were species-dependent. The muscle type or muscle location can also influence the characteristics of fish muscle. The muscle compositions can be a crucial factor determining the physicochemical and functional properties as well as the oxidative stability of Frigate mackerel and catfish muscles during handling, processing and storage. The basic information gained from this study can be used to apply for production of a high grade surimi from those two species.

Acknowledgement

The authors would like to thank Commission on Higher Education, Thailand Research Fund and Walailak University for financial support, Project No. MRG5380109.

References

- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Benjakul, S., Seymour, T. S., Morrissey, M. T., & An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science*, 62, 729-733.

1 Benjakul, S., Visessanguan, W., & Leelapongwattana, K. (2002). Characteristics of
2 muscle from two species of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and
3 *Priacanthus macracanthus*. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 307-326.

4 Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and
5 purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

6 Chaijan, M. (2011). Physicochemical changes of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
7 muscle during salting. *Food Chemistry*, 129, 1201-1210.

8 Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Faustman, C. (2004). Characteristics
9 and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel
10 (*Rastrelliger kanagurta*) caught in Thailand. *Food Research International*, 37,
11 1021-1030.

12 Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Lee, S., & Faustman, C. (2007). The
13 effect of freezing and aldehydes on the interaction between fish myoglobin
14 and myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55,
15 4562-4568.

16 Chaijan, M., Panpipat, W., & Benjakul, S. (2010). Physicochemical properties and
17 gel-forming ability of surimi from three species of mackerel caught in
18 Southern Thailand. *Food Chemistry*, 121, 85-92.

19 Chen, H. H., Chiu, E. M., & Huang, J. R. (1997). Colour and gel-forming properties
20 of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions.
21 *Journal of Food Science*, 62, 985-991.

22 Department of Fisheries. (2006). Production by species for whole marine fishery
23 2002-2006. In *Fishery statistics capture product yearbook 2006* (pp. 20-22).
24 Bangkok: Department of Fisheries.

- 1 Foegeding, E. A., Lanier, T. C., & Hultin, H. O. (1996). Characteristics of edible
2 muscle tissues. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (pp. 880-942). New
3 York, USA: Marcel Dekker.
- 4 Haard, N. F. (1992). Biochemistry and chemistry of color and colour change in
5 seafoods. In G. J. Flick & R. E. Martin (Eds.), *Advance in seafood*
6 *biochemistry*. (pp. 312-319). New York, USA: Technomic Publishing Co., Inc.
- 7 Haard, N. F., Simpson, B. K., & Pan, B. S. (1994). Sarcoplasmic proteins and other
8 nitrogenous compounds. In Z. E. Sikorski, B. S. Pan & F. Shahidi (Eds.),
9 *Seafood proteins* (pp.13-39). New York, USA: Chapman & Hall.
- 10 Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M., & Shiro, K. (1979). Muscle protein
11 composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of*
12 *Scientific Fisheries*, 45, 1435-1441.
- 13 Hultin, H. O., & Kelleher, S. D. (2000). Surimi processing from dark muscle fish. In
14 J. W. Park (Ed.), *Surimi and surimi seafood* (pp. 59-77). New York, USA:
15 Marcel Dekker.
- 16 Ke, P. J., Ackman, R. G., Linke B. A., & Nash, D. M. (1977). Differential lipid
17 oxidation in various parts of mackerel. *Journal of Food Technology*, 12, 37-
18 47.
- 19 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the
20 head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680-685.
- 21 Morrissey, M. T., & Tan, S. (2000). World resources for surimi. In J. W. Park (Ed.),
22 *Surimi and surimi seafood* (pp. 1-21). New York, USA: Marcel Dekker.
- 23 Niwa, E. (1992). Chemistry of surimi gelation. In T. C. Lanier & C. M. Lee (Eds.),
24 *Surimi technology* (pp. 389-427). New York, USA: Marcel Dekker.

- 1 Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E., & Robles-Burgueno, M. R. (2000).
2 Postmortem biochemical characteristic of Monterey sardine muscle stored at
3 0°C. *Journal of Food Science*, 65, 40-47.
- 4 Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamorn, S., Chaijan, M., & Benjakul, S. (2009).
5 Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered
6 using an acid-alkaline process. *Food Chemistry*, 112, 112-119.
- 7 Robinson, H. W., & Hodgen, C. G. (1940). The biuret reaction in the determination of
8 serum protein I. A study of the condition necessary for the production of the
9 stable color which bears a quantitative relationship to the protein
10 concentration. *Journal of Biological Chemistry*, 135, 707-725.
- 11 Shimizu, Y., Toyohara, H. and Lanier, T. C. (1992). Surimi production form fatty and
12 dark fleshed fish species. In T. C. Lanier & C. M. Lee (Eds.), *Surimi*
13 *technology* (pp. 181-207). New York, USA: Marcel Dekker.
- 14 Sikorski, Z. E. (1994). The myofibrillar proteins in seafoods. In Z. E. Sikorski, B. S.
15 Pan & F. Shahidi (Eds.), *Seafood proteins* (pp. 40-57). New York, USA:
16 Chapman & Hall.
- 17 Sikorski, Z. E., Kolakowska, A., & Burt, I. R. (1990). Postharvest biochemical and
18 microbial changes. In Z. E. Sikorski (Ed.), *Seafood: Resources, nutritional*
19 *composition, and preservation* (pp. 55–75). FL, USA: CRC Press, Inc.
- 20 Spinelli, J., & Dassow, J. A. (1982). Fish proteins: their modification and potential
21 uses in the food industry. In R. E. Martin, G. J. Flick & D. R. Ward (Eds.),
22 *Chemistry & biochemistry of marine food products* (pp. 13-25). CT, USA:
23 Avi.
- 24 Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). *Principle and procedure of statistics* (2nd ed.).
25 New York, USA: MacGraw-Hill.

1 Stewart, J. C. M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with
2 ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 104, 10-14.

3 Undeland, I., Ekstrand, B., & Lingnert, H. (1998). Lipid oxidation in herring (*Clupea*
4 *harengus*) light muscle, dark muscle, and skin, stored separately or as intact
5 fillets. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 581-590.

6 Yanar, Y., Celik, M, & Akamca, E. (2006). Effects of brine concentration on shelf-life
7 of hot-smoked tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored at 4°C. *Food Chemistry*,
8 97, 244-247.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Table 1 Proximate compositions of Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles

Compositions (% wet weight)	Frigate mackerel		Catfish	
	Ordinary	Dark	Ordinary	Dark
Moisture	75.01±0.01c	73.70±0.27b	71.55±0.25a	75.68±0.27d
Crude protein	23.08±0.05c	23.21±0.19c	18.70±0.34b	18.19±0.09a
Crude fat	0.84±0.01a	1.90±0.00b	8.54±0.04d	5.05±0.02c
Ash	1.08±0.00a	1.19±0.00c	1.21±0.01d	1.09±0.01b

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

**Different letters under the same row indicate significant differences ($p<0.05$).

Table 2. Nitrogenous constituents in Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles

Nitrogenous composition (mgN/g muscle)	Frigate mackerel		Catfish	
	Ordinary	Dark	Ordinary	Dark
Non-protein nitrogen	5.19±0.01c	4.87±0.00b	2.29±0.01a	2.26±0.01a
Sarcoplasmic protein	10.67±0.12c	11.54±0.36d	9.30±0.06a	9.85±0.24b
Myofibrillar protein	30.81±1.28b	30.02±2.07b	21.99±0.73a	23.52±0.24a
Stromal protein	12.09±0.30b	17.44±1.03d	10.63±0.06a	16.12±0.12c
Alkaline-soluble protein	11.45±0.05b	11.49±0.06b	17.26±0.23c	8.99±0.00a

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

**Different letters under the same row indicate significant differences ($p<0.05$).

Table 3. Pigments, phospholipid, salt, minerals and pH of Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) muscles

Compositions	Frigate mackerel		Catfish	
	Ordinary	Dark	Ordinary	Dark
Carotenoid (mg/g)	0.13±0.01a	0.32±0.01b	4.37±0.07d	4.03±0.05c
Myoglobin (mg/g)	6.19±0.01c	7.52±0.02d	0.75±0.01a	3.01±0.03b
Phospholipid (mg/100g lipid)	23.07±2.97d	16.57±3.03c	9.69±0.61b	2.63±0.42c
Sodium chloride (%)	1.20±0.03c	1.15±0.03c	0.77±0.04a	0.90±0.09b
Minerals (mg/kg)				
Iron	5.67±0.45b	24.84±0.87c	2.88±0.10a	5.45±0.35b
Copper	0.57±0.02b	2.28±0.22c	0.55±0.13b	0.22±0.02a
Selenium	2.29±0.10b	3.23±0.11c	1.22±0.12a	1.23±0.10a
pH	6.16±0.16b	5.96±0.02a	6.86±0.01d	6.69±0.04c

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

**Different letters under the same row indicate significant differences ($p<0.05$).

1 **Table 4.** Color of Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias*
2 *macrocephalus*) muscles

Color	Frigate mackerel		Catfish	
	Ordinary	Dark	Ordinary	Dark
<i>L*</i> value	46.88±0.03b	35.35±0.15a	48.61±0.20c	48.43±0.16c
<i>a*</i> value	8.44±0.04b	9.81±0.30c	7.53±0.11a	8.71±0.22b
<i>b*</i> value	13.02±0.05b	11.79±0.13a	25.09±0.11d	18.96±0.14c
Redness index	0.65±0.00c	0.83±0.03d	0.30±0.00a	0.46±0.01b

3 *Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

4 **Different letters under the same row indicate significant differences ($p<0.05$).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

Figure Legend

Figure 1. SDS-PAGE patterns of dark and ordinary muscles from Frigate mackerel and catfish under reducing condition. M, molecular weight standards; 1, Frigate mackerel ordinary muscle; 2, Frigate mackerel dark muscle; 3, catfish ordinary muscle; 4, catfish dark muscle. MHC, myosin heavy chain; AC, actin.

Figure(s)

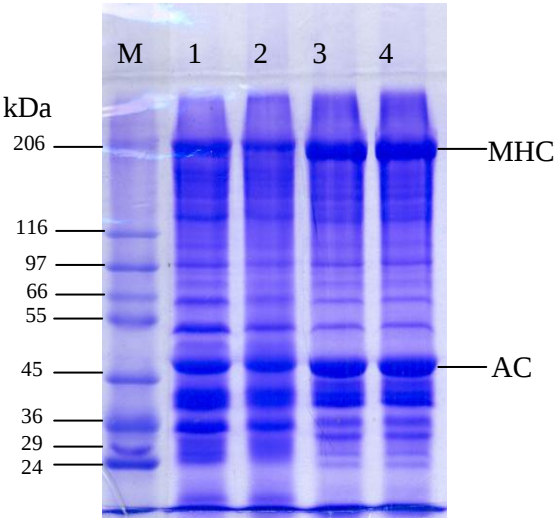


Figure 1